



Microsystèmes pour la préparation d'échantillons sanguins

Elodie Sollier

► To cite this version:

Elodie Sollier. Microsystèmes pour la préparation d'échantillons sanguins. Biophysique [physics.bioph]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT : . tel-00434954

HAL Id: tel-00434954

<https://theses.hal.science/tel-00434954>

Submitted on 23 Nov 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

présentée le 12 Novembre 2009

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1

Spécialité : **Physique**

Option : **Physique pour les Sciences du Vivant**

Elodie SOLLIER

Microsystèmes pour la préparation d'échantillons sanguins

Thèse dirigée par Yves FOUILLET et Jean-Luc ACHARD

JURY

Pr Marc DESMULLIEZ
Pr Bruno LE PIOUFLE
Dr Denis BARTOLO
Pr François BERGER
Pr Jean-Luc ACHARD
Dr Yves FOUILLET

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Président du jury
Directeur de thèse
Directeur de thèse

CEA Grenoble / Leti / Minattec
Laboratoire des Composants Intégrés pour le Vivant

RESUME

Beaucoup de tests de diagnostic médical sont réalisés sur le sang, qui est un échantillon représentatif d'états pathologiques complexes. La séparation des différents constituants du sang est surtout réalisée par centrifugation ; son passage en microsystème reste l'obstacle principal en vue de l'intégration complète de l'analyse sanguine. Notre but est donc de développer une technique simple et rapide, permettant de séparer les éléments sanguins de façon continue et efficace, et intégrable dans un laboratoire sur puce.

Tout d'abord, des dispositifs microfluidiques innovants sont proposés pour l'extraction du plasma, fondés sur le couplage de différents phénomènes microfluidiques passifs. En particulier, ces dispositifs exploitent la couche appauvrie dans un écoulement en canal et l'amplifient par l'effet restriction ainsi que par des singularités géométriques. Un rendement d'extraction maximal de 17% est obtenu à partir de sang dilué au 1:20 et injecté à 100 μ L/min, soit une amélioration d'un facteur 4 par rapport au dispositif de référence. L'influence de la dilution de l'échantillon est analysée, et le plasma extrait est biologiquement validé. En parallèle, des méthodes de tri cellulaire par capture spécifique sont développées, fondées sur la fonctionnalisation de surface et le greffage d'anticorps. Une accroche spécifique et proportionnelle est mise au point et optimisée, à partir de sang total, pour chaque type cellulaire. Des solutions ont été proposées pour l'intégration de ces deux opérations unitaires, séparation microfluidique et tri cellulaire.

Mots clés : *fractionnement sanguin, microfluidique, migration latérale, couche appauvrie, recirculations, capture par affinité, intégration, laboratoire sur puce.*

ABSTRACT

Diagnostic tests are essentially performed on blood which is representative of complex patient pathologic states. For most analysis, the procedure to separate blood elements necessarily includes a centrifugation followed by a physical separation. So it is macroscale, manual and multi-steps, making the crucial blood fractionation step one of the last hurdles towards the total integration of blood analysis in microsystems. Thus our goal is to perform an efficient point-of-care sample preparation device to quickly, easily and reproducibly fractionate bloods elements.

To do so innovating devices are firstly proposed to continuously extract plasma using only passive microfluidic effects. More precisely, these devices are based on the cell-free layer in a channel flow and its strong expansion by restriction effect and geometric singularities. For a 1:20 diluted blood injected at 100 μ L/min, the extraction yield is up to 17% giving a 4-fold improvement regarding a reference device. The influence of the sample dilution is analysed and extracted plasma is biologically validated. In the meantime, methods of cells sorting by affinity capture are developed, using a specific surface functionalization and antibodies arrays. A capture is set out in whole blood for each cell type, experimentally optimized and proved to be specific and proportional. Solutions have been finally proposed in view of the integration of both operations, microfluidic separation and cells sorting.

Keywords : *blood fractionation, microfluidics, lateral migration, cell-free layer, recirculations, affinity capture, integration, lab-on-a-chip.*

Merci ...

Je tiens avant tout à exprimer mes remerciements aux membres du jury : aux professeurs Bruno Le Pioufle et Marc Desmulliez pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture de ce long mémoire, au docteur Denis Bartolo pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail, et au professeur François Berger pour l'honneur qu'il m'a fait de présider ce jury.

J'exprime ensuite toute ma reconnaissance à mes deux directeurs de thèse, Yves Fouillet et Jean-Luc Achard, pour la confiance et la grande liberté qu'ils m'ont accordées tout au long de ces trois années, leur aide et leurs conseils, que ce soit d'un point de vue scientifique, plus technique ou lors de la rédaction du manuscrit. En particulier, je remercie Yves Fouillet pour son enseignement enrichissant sur l'intégration système et sur la mise en place d'un banc microfluidique, et Jean-Luc Achard pour sa présence et ses encouragements dans tous les moments difficiles (un véritable coaching personnalisé), son apport plus académique, et ses multiples tentatives toujours passionnées, patientes et savamment illustrées pour m'inculquer les bases de la mécanique des fluides.

Cette thèse, qui s'inscrit dans le cadre du projet FAST, a été financée par le programme Techno Santé du CEA. Je remercie donc les personnes concernées pour ces financements qui m'ont donné la possibilité de réaliser ce travail.

Mes remerciements vont ensuite à Patrice Caillat qui m'a accueillie au sein du Laboratoire des Composants Intégrés pour le Vivant et m'a permis de découvrir et d'apprécier le travail pluridisciplinaire. De même, je remercie vivement Christine Peponnet - la chef de service - pour m'avoir intégrée dans le Service des Bio System on Chip et - la chef du projet FAST - pour s'être battue pour mon financement de thèse et m'avoir initiée à la démarche projet.

Je remercie également toutes les personnes du DTBS qui m'ont aidée au quotidien, à un moment ou à un autre - en particulier Claude Chabrol, François Baleras, Régis Blanc, Manuel Alessio, Amélie Bellemin Comté, Nadine David, Guillaume Costa, Guillaume Nonglaton, Caroline Fontelaye, Anne-Gaelle Brachet, Sophie Rolati, Lucie Baujard-Lamotte, Denis Bouvier, Sophie Sadet, Gilles Marchand et bien sur Patrick Pouteau - ainsi que toutes les personnes que je n'ai pas citées et qui m'ont encouragée.

Par ailleurs, je remercie plus chaleureusement ma co-bureau Sophie Le Vot-Morales qui a supporté mon humeur très variable au quotidien, Faïdjiba Loe-Mie qui a suivi et subi en même temps que moi les hauts et les bas qui jalonnent une thèse, ainsi qu'Arnaud Rival pour avoir partagé sa récompense Nanobio avec moi (si si j'insiste) : comme d'habitude, je propose de repérer les lieux à UCLA en attendant que tu me rejoignes ok ?! J'adresse un remerciement tout particulier à Myriam Cubizolles, pour sa franchise et son dynamisme qui m'ont donné la patate, le temps qu'elle a consacré à mes relectures, son avis bio, son aide et ses idées...

Enfin, je remercie de tout mon cœur mes deux post-docs préférés qui m'ont aidée tout au long de cette aventure, au début, au milieu ou à la fin, et ont tellement contribué à ce qu'elle est aujourd'hui : Hervé Rostaing, le « point de départ » de mon travail (ou maître padawan) pour tous les services rendus et les coups de main de dernière minute (j'en profite ici pour saluer tes talents culinaires que j'ai bien appréciés) et Magalie Faivre, pour s'être rendue indispensable, que ce soit pour les manip (tous ces moments partagés, si proches, collées au microscope de la salle Genepi), pour la rédaction (tu es la seule que je connaisse qui pourra dire avoir « presque ! » écrit 3 thèses dans sa vie) et pour tout le reste (le chocolat, les sushis, les salades du bonheur mais aussi le sport, les randos...).

J'adresse également quelques lignes ici à Yoann Roupioz, mon encadrant de projet de fin d'études, qui m'a donné l'envie de continuer dans la recherche et m'a offert ma 1^{ère} publication.

Et puis pour finir : (i) Lise, ma coloc forever et mon amie ; qui partage mes rires et mes pleurs, mes moments d'euphorie et d'angoisse, qui est toujours là quand j'en ai besoin (et même quand je n'en ai pas besoin). Merci de m'avoir toujours écoutée, de m'avoir nourrie (et d'avoir nourri 40 personnes lors de mon pot par la même occasion) et de découvrir le monde avec moi. (ii) Mon homme, TomTom ; qui me transmet sa « force tranquille » et qui m'accepte au quotidien (car il faut le dire ici, je ne dois pas être un cadeau). Merci d'être là et d'être toi, tout simplement. (iii) Et bien sur, mes parents ; qui m'ont permis de faire des études et d'être là où j'en suis aujourd'hui, qui m'ont toujours soutenue et ont toujours cru en moi. Un merci tout particulier à mon papa pour m'avoir transmis l'envie d'être curieuse, de voyager, et de me surpasser. Un merci tout particulier à ma maman pour son dévouement sans faille et le temps qu'elle a consacré à traquer les moindres fautes d'orthographe de son œil avisé. Pour tout ça et beaucoup plus encore je vous remercie très fort. Je vous aime et j'espère que, quoi que je fasse ensuite et où que j'aille, vous continuerez à venir me voir.

Je dédie ce travail ...

... à mes parents, pour m'avoir montré que tout est possible quand on y croit,

... à Thomas, mon roc, serein et infaillible.

Table des matières

Table des matières	1
Liste des abréviations	5
Introduction	7
PARTIE 1 : CONTEXTE	7
I. Le sang	13
A. Fonctions et composition	13
A.1. Présentation générale	13
A.2. Fonctions	14
A.3. Composition détaillée	15
A.4. Conclusion	22
B. Quelques points d'hémodynamique	23
B.1. GR et écrémage du plasma	23
B.2. GB, margination et cascade d'adhésion	24
B.3. Hémodynamique et pathologies	25
B.4. Conclusion	26
II. Du prélèvement sanguin à l'analyse	27
A. Le prélèvement	27
B. Le fractionnement sanguin	29
B.1. Le fractionnement transfusionnel et l'aphérèse	29
B.2. Le fractionnement analytique	32
B.3. Conclusion	34
C. L'analyse	35
C.1. Le plasma	36
C.2. Les globules rouges	36
C.3. Les plaquettes	37
C.4. Les globules blancs	38
C.5. Conclusion	39
D. Conclusion : de l'état de l'art macroscopique à l'expression d'un besoin	40
PARTIE 2 : MICROSYSTEMES POUR LE SANG	27
III. Etat de l'art	45
A. La microfluidique	45
A.1. Définition	45
A.2. Microfluidique et écoulements à faibles dimensions	45
A.3. Microfluidique et technologies associées	47
B. Les laboratoires sur puces et leurs applications au sang	48
B.1. Labopuces et généralités	48
B.2. Labopuces et échantillon sanguin	51
C. La préparation d'échantillon sanguin en microsystème	54
C.1. Les techniques passives de séparation	55
C.2. Les techniques actives de séparation	61
C.3. Le biomimétisme	70
C.4. Evaluation comparative des différentes techniques de microfractionnement sanguin	72
C.5. Conclusion et perspectives	74

IV. Matériels, méthodes de caractérisation et de validation	75
A. Modèles physiques considérés	75
A.1. Billes fluorescentes	75
A.2. Sang de cochon	76
A.3. Sang humain.....	77
A.4. Buffy Coat.....	77
B. Microsystèmes et microfluidique	78
B.1. Fabrication des microsystèmes.....	78
B.2. Packaging	81
B.3. Contrôle de l'injection.....	83
C. Méthodes de caractérisation.....	84
C.1. Caractérisation optique.....	84
C.2. Caractérisation biologique.....	85
V. Evaluation de quelques techniques de microfluidique passive	95
A. Banc expérimental	95
B. La filtration	96
B.1. Puces Filtres	96
B.2. Puces Piliers	99
C. La sédimentation	102
C.1. Principe	102
C.2. Dispositif	102
C.3. Résultats	103
C.4. Conclusion.....	104
D. La centrifugation.....	105
D.1. Principe	105
D.2. Dispositif.....	105
D.3. Résultats	106
D.4. Conclusion	108
E. Evaluation comparative.....	109
F. Conclusion et perspectives	110
 PARTIE 3 : DEVELOPPEMENT DE SOLUTIONS FONDEES SUR LA	
MIGRATION LATÉRALE.....	113
VI. Aspects fondamentaux.....	115
A. Comportement mécanique d'un globule dans un canal et migration latérale	115
B. Ecoulements en singularités géométriques	119
B.1. Singularités géométriques et généralités	119
B.2. Singularités géométriques et fractionnement sanguin	120
C. Effet restriction	123
C.1. Effet restriction et généralités.....	123
C.2. Effet restriction et fractionnement sanguin	124
D. Conclusion et perspectives.....	129
VII. Premiers dispositifs et canaux coudés.....	131
A. Dispositif Epingle à cheveux	131
A.1. Principe	131
A.2. Résultats	132
A.3. Conclusion	133
B. Dispositifs Coude en U	134
B.1. Dispositif S et principe.....	134
B.2. Autres dispositifs de coudes en U et résultats préliminaires	137
B.3. Conclusion.....	140
C. Conclusion et perspectives.....	141
VIII. Développement de dispositifs pour l'extraction du plasma.....	143
A. Banc expérimental	143
A.1. Dispositifs microfluidiques	143

A.2. Principe d'extraction	145
A.3. Evaluation des performances d'extraction	145
B. Extractions de référence.....	147
B.1. Référence macroscopique.....	147
B.2. Référence microfluidique	148
C. Effet de l'ajout de singularités géométriques	152
C.1. Oreille et Elargissement	152
C.2. Restriction	155
C.3. Comparaison des différentes singularités géométriques.....	156
D. Effet du couplage des singularités	157
D.1. Couplage restriction & élargissement	157
D.2. Couplage restriction & cavité.....	158
D.3. Couplage restriction & élargissement & cavité.....	159
D.4. Conclusion	161
E. Effet de la dilution de l'échantillon	162
E.1. Principe et dispositifs	162
E.2. Résultats	162
E.3. Conclusion.....	164
F. Validation biologique du plasma extrait.....	164
F.1. Caractérisation de l'hémolyse.....	165
F.2. Caractérisation de l'adsorption des protéines	166
F.3. Caractérisation de la dénaturation des protéines	167
F.4. Caractérisation de la composition cellulaire	169
F.5. Conclusion	172
G. Conclusion et perspectives.....	172

PARTIE 4 : DEVELOPPEMENT DE SOLUTIONS FONDEES SUR LA CAPTURE PAR AFFINITE 143

IX. Capture par affinité : Principe & Protocole	177
A. Principe	177
A.1. Les anticorps	177
A.2. Les antigènes et les marqueurs phénotypiques.....	178
A.3. L'interaction anticorps / antigène et les immunoessais	179
A.4. Application des immunoessais au tri sanguin	180
B. Protocole expérimental	181
B.1. Fonctionnalisation des substrats	181
B.2. Echantillons.....	184
B.3. Incubation et rinçage	185
B.4. Détection	185
B.5. Analyse d'images	186
X. Capture par affinité : Résultats & Applications	187
A. Optimisation du protocole expérimental et quantification.....	187
A.1. Influence de la fonctionnalisation	187
A.2. Etude de la spécificité de l'accroche	190
A.3. Influence de la concentration en sondes.....	191
A.4. Influence de la température et du temps d'incubation.....	192
A.5. Etude de la proportionnalité de l'accroche.....	194
A.6. Conclusion	196
B. Applications & Perspectives	197
B.1. Une application validée pour les PLT : le comptage	197
B.2. Application GR et perspectives : l'accroche de cellules résiduelles	198
B.3. Application GB et perspectives : l'extraction génomique.....	199
B.4. Conclusion.....	202

PARTIE 5 : VERS LA REALISATION D'UN SYSTEME INTEGRE	203
XI. Intégration système	205
A. Approche systémique en vue d'un composant global.....	205
A.1. Les principes de séparation à disposition	205
A.2. Les problématiques à considérer	208
A.3. Intégration d'un protocole simple	209
A.4. Intégration d'un protocole plus complexe.....	211
A.5. Conclusion	214
B. Intégration de l'extraction microfluidique du plasma	214
B.1. Contrôle de l'extraction par pertes de charge.....	214
B.2. Contrôle de l'extraction en pression.....	217
B.3. Mise en série de dispositifs	218
B.4. Conclusion.....	220
C. Intégration de la capture par affinité	221
C.1. Possibilité n°1 : solution globale.....	221
C.2. Possibilité n°2 : solution localisée.....	222
C.3. Conclusion.....	222
XII. Mise en place d'un nouveau packaging	223
A. Contexte.....	223
B. Dispositif microfluidique	224
C. Fabrication du packaging	225
C.1. Spécifications techniques	225
C.2. Solutions envisagées : Connectiques par joint torique	225
C.3. Conception	226
C.4. Contrainte de l'utilisation de capots percés	227
D. Evaluation fluidique du packaging	228
E. Conclusion et perspectives	229
Conclusion.....	231
Publications et communications	233
Revue	233
Communications avec comité de lecture	233
Communications	234
Brevets et extensions	234
Annexes	235
Annexe 1 : Techniques d'extraction des GB	235
Annexe 2 : Explication de l'établissement des écoulements de Dean	240
Références bibliographiques.....	243

Liste des abréviations

Ac : Anticorps
ADN : Acide Desoxyribo-Nucléique
ADNg : ADN génomique
Ag : Antigène
ALT : Aminotransférase Alanine
ATPS: Aqueous Two Phase System
ARN : Acide Ribo-Nucléique
ARNm : ARN messenger
AST : Aminotransférase Aspartate

BD : Becton Dickinson
BHT : Bâtiment Hautes Technologies
BSA : Bovine Serum Albumine

CD : Cluster of Differentiation
CEA : Centre à l'Energie Atomique
CMV : Cyto Megalo Virus
CPT : Cell Preparation Tube
Cy : Cyanine

Da : Dalton
DEP : Diélectrophorèse
DLD : Déplacement Latéral Déterministe

EDI : Eau déionisée
EDTA : acide Ethylène Diamine Tétra Acétique
EFS : Etablissements Français du Sang
EPF : Etherpentafluoré
EWOD : Electro Wetting On Dielectric

FACS : Fluorescent Activated Cell Sorter
FDTS : Perfluorodécyltrichlorosilane
FFA : Free Flow Acoustophoresis
FITC : Fluorescein Iso Thiocyanate

GR : Globule Rouge
GB : Globule Blanc

Hb : Hémoglobine
HCG : Gonadotrophine chorionique (hormone présente chez les femmes enceintes)
HGMF : High Gradient Magnetic Field
Ht : Hématocrite
HTLV : Virus T-Lymphotrope Humain

IgG : Immunoglobuline G

LCA : Antigène Commun à tous les Leucocytes

LCIV : Laboratoire des Composants Intégrés pour le Vivant

LCR : Liquide Céphalo Rachidien

LDL : Cholestérol Low Density Protein

LFCM : Laboratoire de Fonctionnalisation et Chimie pour les Microsystèmes

LOC : Lab on a Chip ou Labopuce

MACS : Magnetic Cell Sorting

MEB : Microscope Electronique à Balayage

NFS : Numération Formule Sanguine

PBS : Phosphate Buffer Saline

PC : Polycarbonate

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDMS : Polydimethylsiloxane

PFF : Pinched Flow Fractionation

PLT : Plaquette

PMMA : Polyméthylméthacrylate

POC : Point of Care

PRP : Plasma Riche en Plaquettes

RIE : Gravure Ionique Réactive

UV : Ultraviolets

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VHB : Virus de l'Hépatite B

VHC : Virus de l'Hépatite C

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

Introduction

Les microsystèmes, dont le concept émerge à la fin des années 80, sont des composants qui concernent de multiples secteurs d'applications tels que les transports, la santé, l'environnement... Leur développement s'appuie sur les avancées technologiques réalisées dans le domaine des microtechnologies. Ainsi, le CEA Leti se consacre depuis quelques années à l'élaboration et la fabrication de microsystèmes intégrés pour les analyses biologiques : les laboratoires sur puces ou labopuces (« Lab on Chip » ou LOC), qui permettent d'intégrer l'ensemble des étapes d'un protocole biologique sur des systèmes de petite taille.

Comme l'urine, les biopsies ou la salive, le sang sert d'échantillon biologique. La facilité de son prélèvement et sa représentation complète de l'état physiopathologique du patient lui confèrent un statut privilégié pour beaucoup d'analyses médicales. La complexité de cette suspension biologique fait de l'intégration d'un tel fluide dans un microsystème un véritable défi, avec des difficultés bien spécifiques. Ainsi, à l'échelle macroscopique, il est souvent nécessaire de préparer l'échantillon sanguin avant son analyse, c'est-à-dire d'en séparer les différents constituants pour faciliter le diagnostic. Ce fractionnement est réalisé la plupart du temps par centrifugation, éventuellement suivie d'une séparation manuelle. De nombreux laboratoires se sont penchés sur le passage en microsystème, sans prendre en compte cette opération multi-étapes de fractionnement. Ainsi, celle-ci reste le frein principal à l'intégration complète du laboratoire d'analyses sanguines en microsystème.

Le but de ce travail de thèse est donc de développer une technique simple et rapide pour séparer les différents éléments du sang de façon continue et efficace, puis d'intégrer cette opération de fractionnement dans un labopuce.

Compte-tenu de son sujet, cette thèse possède un contenu fortement pluridisciplinaire et combine techniques et savoir-faire généralement éloignés. L'organisation du mémoire présente donc des difficultés spécifiques. Une attention particulière a été apportée à bien dégager la démarche suivie et à souligner les liens logiques qui unissent les différentes études conduites. Au niveau de cette introduction, plutôt que d'énumérer les différents chapitres et leur contenu, il nous a semblé plus instructif de présenter le plan de la thèse à travers l'organigramme de la Figure Intro.1. Les chapitres sont regroupés en cinq parties distinctes, que le lecteur pourra lire indépendamment. Chaque partie sera précédée d'une présentation de son organisation générale, et chaque chapitre sera introduit par une description rapide de son contenu.

En introduisant le contexte général de la préparation d'échantillon sanguin, la **Partie 1** permet d'exprimer le besoin auquel cette thèse tentera de répondre. Cette thématique étant nouvelle dans le laboratoire, elle a nécessité une période de défrichage non négligeable, qui justifie qu'on la développe ici. A une toute autre échelle, mais pour les raisons énoncées précédemment, il a également fallu se familiariser avec l'utilisation du sang en microsystème. C'est pourquoi la **Partie 2** s'intéresse au passage du sang et de son fractionnement des échelles macroscopiques à microscopiques. Une fois l'existant mis à plat, des études plus approfondies et originales sont possibles. L'état de l'art du micro fractionnement sanguin a montré entre autre qu'il était difficilement envisageable de mettre au point un principe de séparation applicable à un fractionnement global, c'est-à-dire l'extraction du plasma et le tri cellulaire. Le couplage de différentes techniques semble indispensable. C'est l'objectif des **Parties 3 et 4** qui développent les deux types de solutions proposées au cours de cette thèse : la microfluidique passive et la capture par affinité. Enfin la **Partie 5** constitue une partie plus prospective sur la réalisation d'un système de fractionnement intégré.

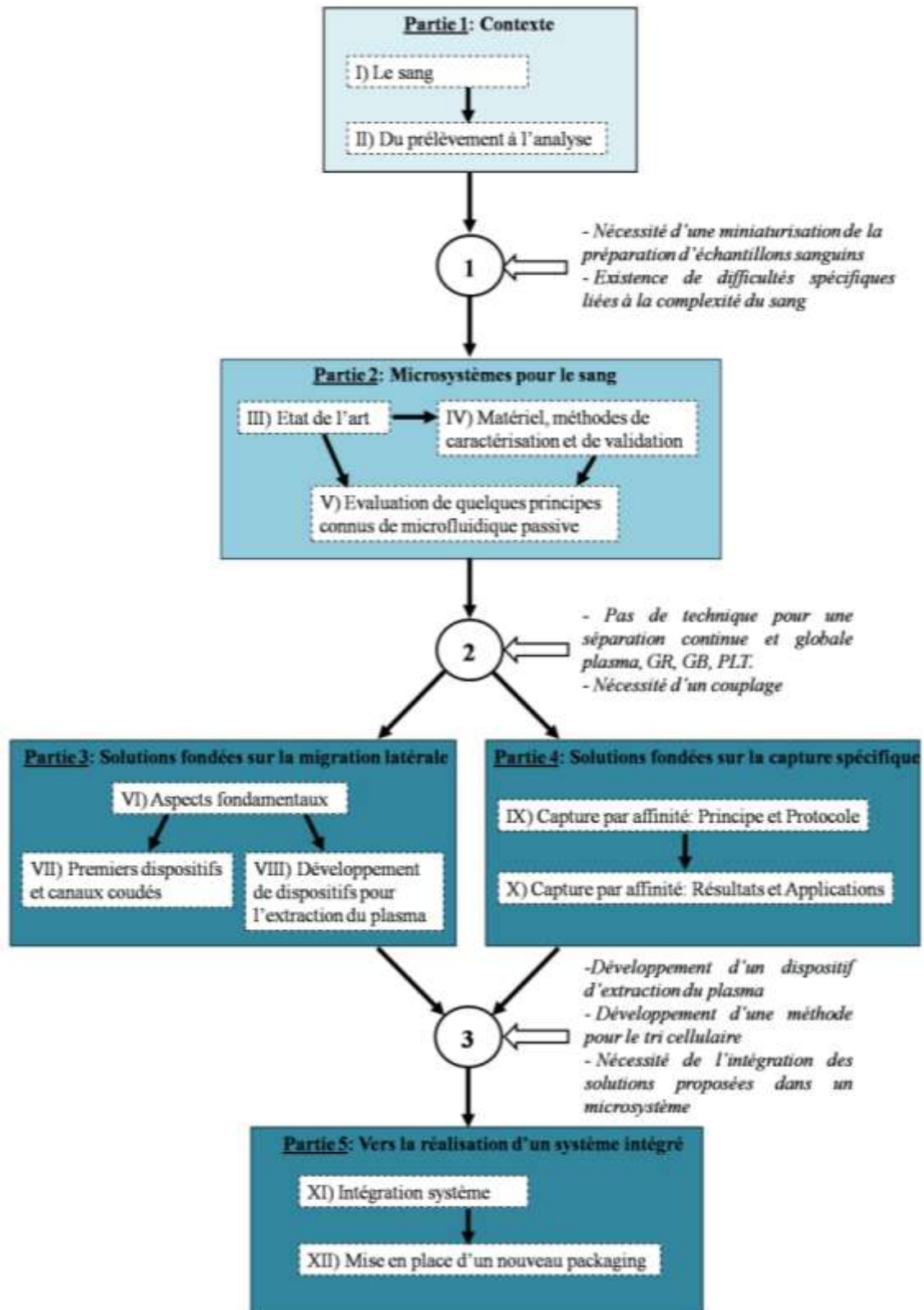


Figure Intro.1 : Organigramme présentant les différents chapitres de la thèse et leurs interactions

Partie 1 : Contexte

A fin de mettre en évidence les complexités de l'échantillon sanguin, le Chapitre 1 présente tout d'abord quelques bases d'hématologie, avec des notions de concentrations, de dimensions, de propriétés et de contenu. Par ailleurs, pour justifier de l'importance des composants sanguins dans les analyses, nous abordons également leurs principales fonctions dans l'organisme et leur comportement dans l'écoulement vasculaire. Ensuite, afin de comprendre l'intérêt et le besoin de la miniaturisation de cette préparation d'échantillon, le Chapitre 2 présente le cheminement classique d'un tube de sang, de son prélèvement à sa préparation et son analyse. Puis nous nous intéressons aux systèmes macroscopiques existants ainsi qu'à leurs limitations.

I. Le sang

Le sang sert d'échantillon biologique comme l'urine, les biopsies, les cheveux, la salive, le sperme.... Le sang se définit comme une suspension biologique complexe constituée d'une phase porteuse et de différentes populations cellulaires. Comme nous le verrons dans le Chapitre 3, l'intégration d'un tel fluide dans un microsystème est un défi, avec des difficultés bien spécifiques, différentes de celles rencontrées dans le cas par exemple d'une puce à ADN ou d'une puce à cellule unique où les cibles sont en solution aqueuse. En effet, dans le cas du sang, de nombreuses particularités sont à prendre en compte, comme la viscosité, la déformabilité et la fragilité des cellules qu'il contient.

Le but des bases d'hématologie présentées dans ce Chapitre 1 est donc de fournir au lecteur quelques éléments qui seront utiles pour la suite, c'est-à-dire quelques notions relatives aux proportions des différents constituants, à leurs dimensions, à leurs propriétés ainsi qu'à leur contenu. Par ailleurs ces constituants sont les cibles directes des analyses sanguines qui seront abordées dans le Chapitre 2 et dont l'intégration est le but final de ce travail. C'est pourquoi il nous a paru intéressant de présenter également les principales fonctions de ces constituants dans l'organisme et leur participation dans certains mécanismes biologiques essentiels. Enfin, nous verrons comment tous ces éléments se comportent lors de l'écoulement du sang dans les veines.

A. Fonctions et composition

A.1. Présentation générale

Le sang est une suspension complexe qui comprend deux phases : une phase liquide, appelée le plasma (environ 55% du volume sanguin), et une phase solide (environ 45%), composée des cellules (appelées éléments figurés). Parmi ces cellules, on distingue les globules rouges (GR, 98% de la phase solide), les globules blancs (GB, 1%) et les plaquettes (PLT, 1%), respectivement à gauche, à droite et au milieu de la Figure I.1.a. Ces deux phases sont visibles distinctement lorsqu'on centrifuge un tube de sang (Figure I.1.b) : la phase surnageant est constituée du plasma, généralement jaunâtre, tandis que les différentes cellules, plus denses, forment la partie inférieure avec un anneau central constitué des globules blancs et des plaquettes.

Dans un souci de concision, on utilisera par la suite les abréviations suivantes : GR pour les globules rouges, GB pour les globules blancs et PLT pour les plaquettes.

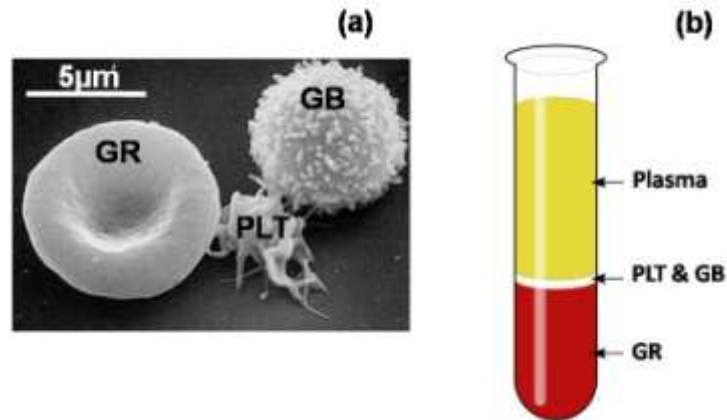


Figure I.1 : (a) Un GR, une PLT et un GB vus au microscope électronique à balayage. (b) Centrifugation d'un échantillon sanguin et visualisation des différents composants ; Plasma, PLT, GB et culot de GR. D'après www.common.wikimedia.org.

Le sang est le tissu conjonctif véhiculé par le système circulatoire. Pour un homme adulte de 65 kilos, le sang occupe un volume total de 5 à 6 litres, soit 7 à 8% du poids du corps, contre 250mL chez un nouveau-né et environ 3 L chez un enfant. En termes de débit, de 65 à 100 cm³ par contraction, soit 5 à 7 litres de sang par minute sont envoyés dans les artères. Le sang est donc un fluide en déplacement permanent dans l'organisme, ce qui justifie que l'étude de son comportement et de son écoulement soit essentielle.

A.2. Fonctions

La fonction première du sang est le transport. En effet, le sang sert à diffuser l'oxygène et les éléments nutritifs nécessaires au bon fonctionnement de tous les tissus du corps. Il évacue les déchets tels que le dioxyde de carbone ou les déchets azotés. Il permet également d'amener aux tissus les cellules et molécules du système immunitaire, telles que les GB, les anticorps, les facteurs de coagulation, etc.... A ce titre, le sang a donc un rôle important dans la défense de l'organisme. Enfin il permet de transporter les hormones dans tout le corps.

Pour pouvoir réaliser toutes ces fonctions, le sang circule dans tout l'organisme, et ce de manière unidirectionnelle. Il est mis en mouvement par le cœur grâce à ses contractions, en suivant deux circuits bien distincts détaillés dans la Figure I.2.a. A partir du cœur, il va dans les poumons où il se charge en O₂ et se décharge en CO₂, c'est la petite circulation, ou circulation pulmonaire. Au cours de ce circuit, le sang devient rouge sombre lorsqu'il est désoxygéné et riche en CO₂ puis rouge vif lorsqu'il se charge en O₂. Parallèlement, le sang circule à travers tous les organes et tissus du corps via les vaisseaux sanguins pour acheminer les combustibles et les déchets, c'est la grande circulation, ou circulation systémique.

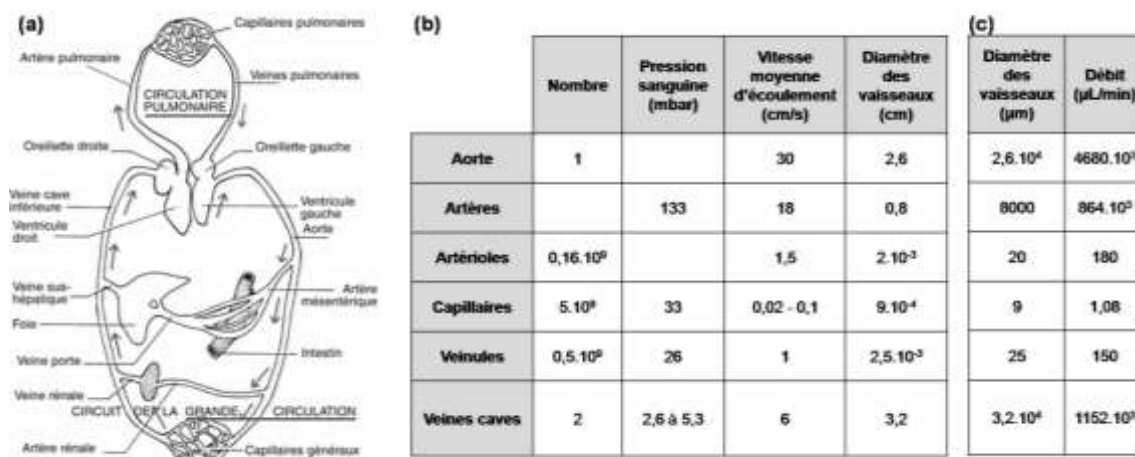


Figure I.2 : Le système circulatoire humain. (a) Schéma général extrait de www.quid.fr/2007. Dans la circulation pulmonaire, le sang alimente les poumons. Dans le circuit de la grande circulation, tous les organes sont approvisionnés, en particulier le foie, le rein et l'intestin. (b) Quelques ordres de grandeur à propos des différents vaisseaux sanguins [SIL 01]. (c) Débits estimés à l'aide des données précédentes et diamètres en μm .

Arrêtons-nous maintenant sur quelques ordres de grandeur relatifs aux dimensions, débits et pressions. Ce système circulatoire est organisé comme un réseau routier, comprenant de multiples canaux, de différentes dimensions [SIL 01]. Il y a les artères - assimilables à des autoroutes - qui conduisent le sang du cœur vers les organes, les veines qui ramènent au cœur le sang appauvri en oxygène, mais également les artérioles, les veinules et les capillaires. Les principales propriétés du système vasculaire sont données dans le tableau de la Figure I.2.b. La vitesse du sang peut varier de 30cm/s dans l'aorte à moins de 1mm/s au niveau des capillaires. La pression, quant à elle, est de 33mbar dans les capillaires et peut atteindre 133mbar dans les artères. Les capillaires sont les canaux les plus petits du système circulatoire ($\varnothing=3$ à $16\mu\text{m}$). Leur taille est comparable voire inférieure à celle des GR ($\varnothing=8\mu\text{m}$) qui peuvent y circuler en se déformant. C'est à ce niveau que se font les échanges entre le sang et les tissus. Ces capillaires, organisés en réseaux parallélisés, forment un véritable microsysteme naturel. Afin de faire un parallèle avec nos microsystemes, les débits équivalents sont estimés à partir des données précédentes dans la Figure I.2.c. Ces débits sont de 1, 150 et $180\mu\text{L/min}$ respectivement dans les capillaires, veinules et artérioles, ces trois vaisseaux étant de l'ordre de la dizaine de μm . Nous voyons ici que le microsysteme sur lequel nous allons travailler va donc fonctionner avec des ordres de grandeur équivalents à ceux de la microvascularisation sanguine. Il sera donc intéressant de voir plus en détails comment le sang s'écoule dans ces canaux naturels afin, pourquoi pas, de s'en inspirer.

A.3. Composition détaillée

A.3.1. Le plasma

C'est la partie liquide du sang. Elle constitue environ 55% du volume sanguin total et 5% environ du volume des liquides de l'organisme humain.

Le plasma est composé approximativement de 90% d'eau. Les 10% restants sont constitués d'éléments très divers, impliqués dans de nombreux processus

physiologiques, tels que des protéines de transport (comme l'albumine) ou de défense immunitaire (telles que les immunoglobulines, appelées plus communément les anticorps comme nous le verrons dans le Chapitre 9), des ions, des sels, des vitamines, des hormones (comme l'insuline ou l'HCG*), des enzymes (comme les transaminases, dont nous discuterons plus loin dans le Chapitre 4), des lipides, des marqueurs tumoraux et parfois même des pathogènes (tels que le VIH*). Une composition détaillée du plasma ainsi que les principales fonctions de ces composants sont présentées dans le tableau ci-dessous (Tableau I-1).

Composant			Concentration	Principales fonctions
Solvant	Eau		910 g/L	= Solvant et ionisant = Milieu de diffusion et de transport = Rôle thermique
Solutés minéraux	Cations	Na ⁺ Ca ²⁺ K ⁺ Mg ²⁺	140 mmol/L 2.3 mmol/L 4.8 mmol/L 0.8 mmol/L	= Equilibre osmotique & potentiel membranaire = Contraction musculaire, Coagulation = Equilibre osmotique & potentiel membranaire = Activité enzymatique
	Anions	Cl ⁻ PO ₄ ³⁻ SO ₄ ²⁻	105 mmol/L 4 mmol/L 0.2 mmol/L	= Permettent l'équilibre osmotique
	Oligo-éléments	Fer Iode Zinc Cuivre Fluor	[Fe] - 8 à 180 mg/100mL	= Constituant de l'hème de l'hémoglobine = Participe à la fabrication des hormones thyroïdiennes = Participe aux réactions enzymatiques = Constituant de certaines enzymes = Constituant de l'émail des dents
Solutés organiques	Protéines		60 à 80 g/L	= Transport de molécules = Défense immunitaire = Facteurs de coagulation
	Substances azotées non protéiques		0.3 g/L	= Déchets du métabolisme
	Glucose		1 g/L	= Substrat énergétique
	Lipides	Triglycérides	3 g/L	= Substrats métaboliques
		Cholestérol	2 g/L	= Composant majeur des membranes cellulaires = Précurseur de nombreuses molécules, comme les hormones stéroïdes
	Hormones		< 2 mg/mL	= Molécules d'information pour la régulation des fonctions
	Vitamines		< 25 mg/L	= Participent au bon fonctionnement des organes
Gaz respiratoires	O ₂ CO ₂		2 mL/L 20 mL/L	= Substrat respiratoire = Déchet métabolique

Tableau I-1 : Tableau de synthèse sur les divers composants du plasma humain, leur concentration et leur fonction. Tableau adapté de www.musibiol.net/biologie/cours/sang.

Le plasma est peu visqueux, sa viscosité étant légèrement supérieure à celle de l'eau (de 1,2 à 2.10⁻³Pa.s à 37°C). Sa composition - une modification du pH ou une augmentation de la concentration en fibrinogène par exemple - a un effet important sur les propriétés rhéologiques du sang : le pH modifie la déformabilité des GR tandis que le fibrinogène détermine leur degré d'agrégation [COL 04, BAS 03, CHI 87].

* HCG = Gonadotrophine chorionique. C'est l'hormone présente chez les femmes enceintes.

* VIH = Virus de l'Immunodéficience Humaine

La distinction entre sérum et plasma est importante car certaines analyses portent uniquement sur le sérum ou inversement. Lorsque la coagulation est empêchée par l'utilisation d'un anticoagulant (c'est-à-dire, comme nous le verrons au Chapitre 2, une molécule qui bloque la coagulation), la portion de liquide obtenue après centrifugation s'appelle le plasma et contient la protéine fibrinogène. En revanche, si la coagulation a eu lieu, la fraction liquide obtenue après centrifugation est appelée sérum. Elle ne contient plus de fibrinogène, alors utilisée pour la polymérisation du monomère de fibrine en caillot lors de la coagulation. Cet anticoagulant est essentiel dans le cas d'un écoulement du sang en microsystème car les caillots ainsi formés deviennent des bouchons dans les microcanaux.

A.3.2. Les éléments figurés

Comme énoncé plus haut, trois types d'éléments figurés sont présents dans le sang : les GR (ou érythrocytes), les GB (ou leucocytes) et les PLT (ou thrombocytes). Chaque cellule se différencie des autres par sa morphologie, sa fonction, et son cycle de vie. La production des cellules sanguines et leur remplacement continu se fait dans la moelle osseuse au cours d'un processus appelé hématopoïèse, illustrée Figure I.3. Toutes les cellules sanguines sont produites à partir d'une même souche, la cellule souche totipotente, ou hémocytoblaste. Ces cellules souches vont se différencier en lignées cellulaires pour engendrer, après différents processus, des cellules sanguines matures. Seules les cellules matures et fonctionnelles passent dans le sang.

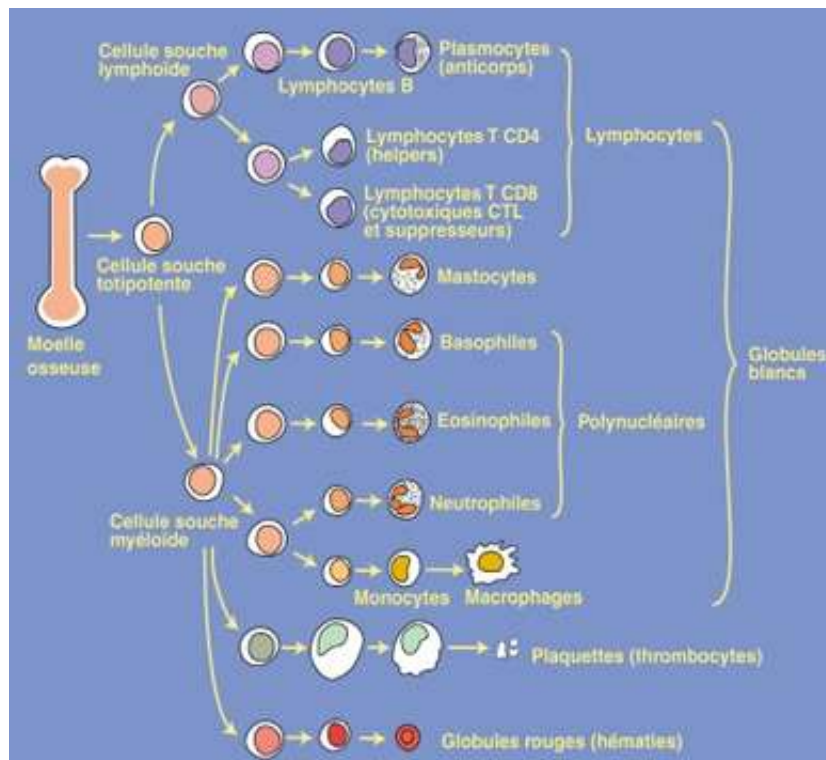


Figure I.3 : Schéma illustrant le phénomène de l'hématopoïèse, c'est-à-dire la création et le renouvellement, après différenciation, de tous les types de cellules sanguines et ce à partir d'une cellule souche commune : l'hémocytoblaste. D'après www.cellbiol.net.

Ainsi, bien qu'issues d'une même cellule souche, les cellules présentes dans le sang sont différenciées. Elles varient très fortement en taille, volume et déformabilité comme nous allons le voir par la suite.

Les globules rouges

Les GR (appelés aussi hématies ou érythrocytes) se présentent sous la forme de petits disques biconcaves, de 7 à 8 μm de diamètre et de 1,5 μm d'épaisseur, comme illustré par le schéma de la Figure I.4. Cette forme discoïdale permet entre autre d'obtenir une surface maximale ($135\mu\text{m}^2$) par rapport au volume ($90\mu\text{m}^3=90\text{fL}$), favorisant la diffusion d'une grande quantité d'oxygène à travers la membrane.

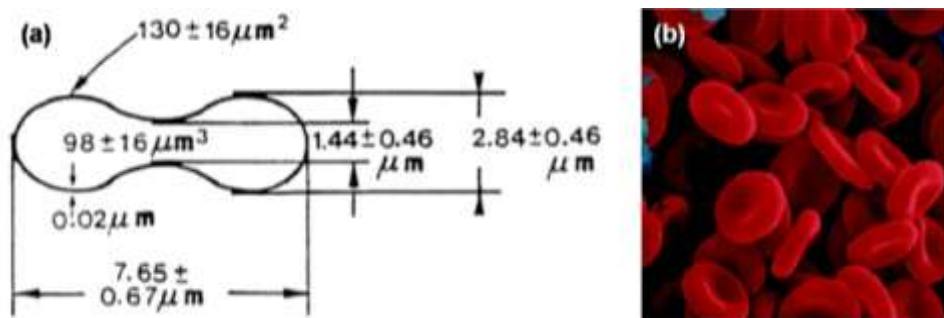


Figure I.4 : Le globule rouge. (a) Schéma d'un GR humain et dimensions, d'après [EVA 72]. (b) Photographie de globules rouges sains et discocytes, d'après www.unilim.fr.

C'est une cellule qui n'a ni noyau ni organites cellulaires. Elle est uniquement constituée d'eau, d'ions (tels que le potassium) et surtout d'hémoglobine (Hb). L'hémoglobine est une hétérotétramère protéique constituée de 4 chaînes polypeptidiques ; 2α (15,1kDa) et 2β (15,8kDa). Chez l'adulte, elle permet le transport de l'oxygène par l'intermédiaire d'atomes de fer qui sont liés à l'hème, ce qui donne sa couleur rouge au GR. Chaque GR peut renfermer 280 millions de molécules d'hémoglobine.

La fonction principale du GR est donc de transporter l'oxygène des poumons vers les tissus grâce à cette hémoglobine qu'il contient. C'est pourquoi un GR humain parcourt environ 500.000 kms de circuit vasculaire (d'après www.fr.encarta.msn.com), au cours de sa vie d'environ 120 jours.

Comme il n'y a qu'1 GB pour 30 PLT et 600 GR, le comportement rhéologique du sang est étroitement lié à celui des GR : leur proportion (c'est-à-dire l'hématocrite) et leur déformabilité sont des facteurs essentiels pour la viscosité du sang. Deux éléments définissent la déformabilité de cette poche d'hémoglobine qu'est le GR : son contenu et sa membrane. L'hémoglobine, fluide visqueux de viscosité $6.10^{-3}\text{Pa.s}^{-1}$, définit la viscosité interne du GR (viscosité du sang : 4 à $6.10^{-3}\text{Pa.s}^{-1}$).

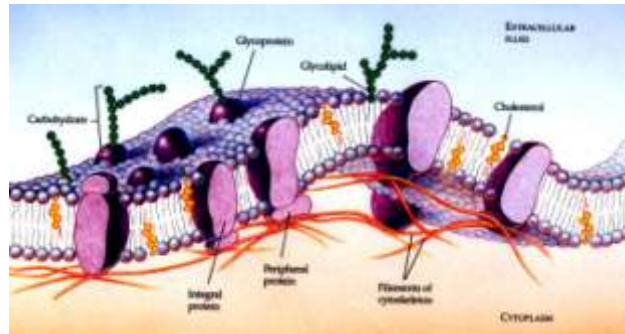


Figure I.5 : Membrane du GR et composition. D'après www.ocr.org.uk.

Par ailleurs, la membrane du GR donne ses propriétés élastiques au GR. Les GR sont capables de se déformer pour passer dans des capillaires sanguins plus petits qu'eux, c'est la plasticité globulaire. Ces propriétés élastiques proviennent uniquement de la membrane du GR. Comme illustré Figure I.5, elle est constituée d'une bicouche lipidique sous laquelle est ancré un réseau de spectrine, le cytosquelette, composé de longs filaments reliés entre eux par des complexes de jonction. Certaines protéines, qualifiées de transmembranaires, traversent la membrane du GR de part en part et servent de point d'accroche au cytosquelette (comme par exemple les protéines caractéristiques des groupes sanguins). C'est cette topologie du cytosquelette, additionnée des propriétés intrinsèques de la spectrine, qui semble expliquer l'élasticité de la membrane du GR. Une description détaillée de l'élasticité de la membrane du GR est disponible dans la thèse de G. Lenormand [LEN 01] consacrée à ce sujet, ainsi que dans les publications d'Evans et col. [EVA 72, EVA 76]. L'écoulement du GR sera abordé plus en détails dans la section suivante.

Les globules blancs

Les GB (appelés aussi leucocytes) sont les cellules immunitaires. Le sang en contient de $4 \text{ à } 10.10^3/\mu\text{L}$ pour un adulte en bonne santé. Les GB sont de tailles et fonctions très variables. On distingue ainsi trois grandes catégories : les monocytes (2-10%), les lymphocytes (20-45%) et les granulocytes (ou polynucléaires). Les granulocytes sont eux-mêmes répartis en neutrophiles (40-75% des granulocytes), éosinophiles (1-6%) et basophiles (0-1%).

La fonction des GB consiste à lutter contre différentes infections de différentes façons. L'ensemble de leurs caractéristiques est présenté dans le Tableau I-2 que nous allons commenter :

- ✓ Dans la famille des polynucléaires (ainsi appelés car ils ne contiennent qu'un noyau mais constitué de plusieurs lobes), les neutrophiles (de $2 \text{ à } 6.10^3/\mu\text{L}$), les éosinophiles (de $0,4 \text{ à } 4,8.10^2/\mu\text{L}$) et les basophiles (de $0 \text{ à } 1,1.10^2/\mu\text{L}$) sont respectivement responsables de la réponse aux infections bactériennes, aux infections parasitaires et aux allergies.
- ✓ Les monocytes (de $1 \text{ à } 8.10^2/\mu\text{L}$) ont un rôle de phagocytose car ils ingèrent les bactéries et les débris cellulaires. Lorsqu'ils migrent du sang vers les tissus, ils deviennent les macrophages. Par ailleurs, ils présentent les pathogènes ingérés aux lymphocytes T afin de déclencher la reconnaissance et la réponse immunitaire.

✓ Les lymphocytes (de $1 \text{ à } 4,8.10^3/\mu\text{L}$) sont impliqués dans les réactions immunitaires. On distingue les lymphocytes B et les lymphocytes T (les T cytotoxiques CD8+, les T auxiliaires CD4+, et les T suppresseurs). Les lymphocytes B fabriquent les anticorps complémentaires des antigènes détectés (sur une bactérie par exemple) et peuvent même les garder en mémoire. Les lymphocytes T induisent et régulent la réponse immunitaire et tuent les cellules infectées. Dans le cas d'une infection par le VIH, ce sont les lymphocytes T auxiliaires (CD4+) qui ne jouent plus leur rôle de défense contre les bactéries intracellulaires.



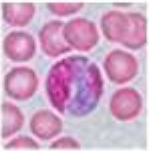

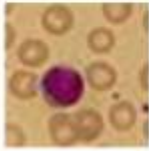





	Monocytes ↓ Macrophages	Granulocytes (ou Polynucléaires)			Lymphocytes
		Neutrophiles	Eosinophiles	Basophiles	
%	6%	65%	4%	< 1%	25%
Dimensions	15 - 30 μm	10 - 15 μm	10 - 15 μm	10 - 12 μm	7 - 15 μm
Photo					
Schéma					
Fonctions	<ul style="list-style-type: none"> - Transformation en macrophage. - Phagocytose. - Présentation du pathogène au lymphocyte T. 	<ul style="list-style-type: none"> - Défense contre infections bactériennes. - Phagocytose des bactéries. 	<ul style="list-style-type: none"> - Défense contre infections parasitaires. 	<ul style="list-style-type: none"> - Réponse allergique et inflammatoire. - Libération d'histamine. 	<ul style="list-style-type: none"> - Production d'Ac. - Mémoire du système immunitaire. - Coordination réponse immunitaire. - Destruction cellules infectées.

Tableau I-2 : Récapitulatif des différents leucocytes, dimensions, photographies et fonctions. Adapté de www.fr.wikipedia.org.

Les GB sont généralement assimilés à des sphères d'environ 10 μm de diamètre. En situation non pathologique, ils ne perturbent pas l'hydrodynamique de la circulation des GR. Leur particularité est leur comportement lors de la cascade d'adhésion leucocytaire. En effet les GB peuvent adhérer à la paroi des vaisseaux sanguins, se déformer et la franchir pour pénétrer dans les tissus et rejoindre le lieu de l'inflammation. Nous aborderons ces phénomènes ainsi que l'écoulement des GB dans la partie suivante.

Les plaquettes

Les PLT (appelées aussi thrombocytes) ne sont pas des cellules au sens réel du terme mais plutôt des unités granuleuses de 2 à 4 μm . Un humain en bonne santé en contient de 150 à 500.10³/ μL . Ce sont des fragments cellulaires qui ne possèdent pas de noyau. Elles sont issues de la fragmentation dans la moelle osseuse de cellules géantes, les mégacaryocytes. Ce sont des petits sacs contenant des substances chimiques actives (telles que la sérotonine, le calcium, l'ATP, des facteurs de croissance...) permettant le processus de coagulation et plus précisément la formation du caillot sanguin.

En effet, leur rôle principal dans le sang est de participer à l'hémostase*. Lorsque la paroi vasculaire est lésée, les PLT viennent adhérer à la lésion endothéliale, deviennent sphériques puis s'agrègent pour la colmater, phénomène appelé communément le clou plaquettaire.

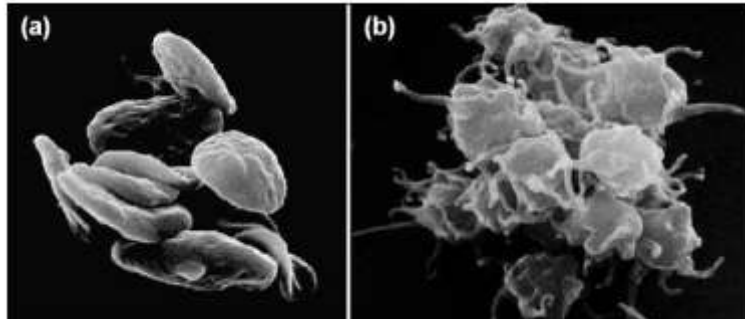


Figure I.6 : Photographies de PLT. (a) Les PLT à l'état de repos sont en forme de disques lisses. (b) Les PLT à l'état activé ont, quant à elles, une forme irrégulière avec de nombreuses protubérances, les filopodes. D'après www.perfusion.com.

Les PLT sont discoïdes à l'état normal, comme dans la Figure I.6.a. Lorsqu'elles sont activées, lors du processus de coagulation par exemple, elles se mettent à gonfler, deviennent sphériques et émettent des prolongements plus ou moins longs (Figure I.6.b), les filopodes, qui viennent se coller à la paroi vasculaire. Au bout de 8 à 10 jours, les PLT se dégradent et ne peuvent plus assurer leurs fonctions. Malgré leur nombre important, elles ne perturbent pas la circulation sanguine du fait de leur faible dimension [COL 07].

Une synthèse de ces éléments figurés et de leurs caractéristiques principales est présentée dans le Tableau I-3.

* L'hémostase est l'ensemble des phénomènes physiologiques qui arrêtent le saignement pour éviter l'hémorragie.

	Erythrocytes (GR)	Leucocytes (GB)	Thrombocytes (PLT)
Concentration	4,2 - 5,4.10 ⁶ /μL	4 - 11.10 ³ /μL	150 - 400.10 ³ /μL
Diamètre	6 - 9 μm	7 - 30 μm	2 - 4 μm
Forme	Disque biconcave	Sphérique	Discocyte
Contenu et spécificités	Hémoglobine	Noyau, cytoplasme organites...	Substances actives pour la coagulation
Surface	120 - 163 μm ²	300 - 625 μm ²	16 - 35 μm ²
Volume	80 - 100 μm ³	160 - 450 μm ³	5 - 10 μm ³
Masse volumique	1.089 - 1.1 g.cm ⁻³	1,055 - 1,085 g.cm ⁻³	1.04 - 1.06 g.cm ⁻³
Principales fonctions	Transport de l'oxygène	Défense immunitaire	Hémostase

Tableau I-3 : Tableau de synthèse sur les différents éléments figurés du sang humain, leurs caractéristiques et leurs fonctions.

A.4. Conclusion

En conclusion, il apparait clairement que le sang est un milieu fluide plus complexe qu'une simple solution aqueuse. Le plasma, qui représente environ 55% du volume sanguin, nous intéresse tout particulièrement car il est très riche en analytes divers, en particulier les protéines. Le GR est le type cellulaire le plus représenté (98% du volume cellulaire) relativement aux GB (1%) et aux PLT (1%).

Ces différentes populations cellulaires sont très variables, petites ou grandes, déformables ou non, rares ou en surnombre, avec des contenus biologiques très divers. La problématique est d'exploiter au mieux cette particularité afin de séparer ces constituants. L'ensemble de ces différences explique également que les écoulements d'un GR ou d'un GB ne soient pas les mêmes. C'est ce que nous allons voir dans la section suivante.

B. Quelques points d'hémodynamique

Nous nous proposons de décrire ici, de manière non exhaustive, l'écoulement du sang dans les veines et ses caractéristiques, principalement d'un point de vue phénoménologique. En effet, cet écoulement du sang dans la microcirculation est très complexe et fait l'objet de nombreuses études [MCH 01] ; il n'est pas prévu de les recenser dans ce travail. La difficulté des expérimentations sur l'homme rend encore plus incomplète sa compréhension. Il est également très difficile d'établir un modèle fluide simple, comme expliqué dans [VIT 03].

La Figure I.7 représente un écoulement de sang dans un capillaire et permet de visualiser les principaux phénomènes qui en sont caractéristiques. Tout d'abord une zone apparaît plus claire au niveau des parois épithéliales du vaisseau ; c'est la couche appauvrie en GR, tandis que les GB se déplacent au voisinage de ces parois en roulant très lentement sur eux-mêmes. Ces différents phénomènes sont décrits par la suite.

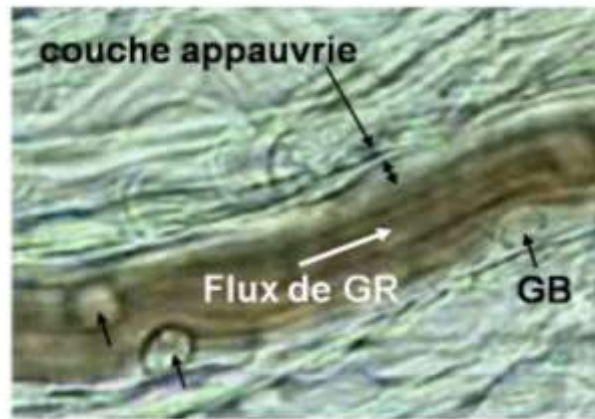


Figure I.7 : Ecoulement de sang dans un capillaire et phénomènes d'hémodynamique associés ; couche appauvrie et roulement des GB. Les petites flèches noires indiquent les GB.

B.1. GR et écrémage du plasma

Le premier phénomène est le mouvement des GR qui, dans un écoulement de Poiseuille, tendent à se déplacer vers le centre du vaisseau ; c'est la migration axiale, appelée également en hémorhéologie l'effet Fåhræus. Ces problèmes de migration seront abordés dans le Chapitre 6. Il en résulte au voisinage des parois une région appauvrie en GR et, par conséquent, riche en plasma ; c'est la couche appauvrie (ou « cell-free layer »). Cette dernière agit comme une couche lubrifiante, avec une viscosité apparente inférieure à la viscosité au centre de la suspension,

$$\eta_{app} = \eta_{centre} \left(1 - \frac{2\delta}{D_v}\right) \quad (\text{I-1})$$

avec η_{app} la viscosité apparente, η_{centre} la viscosité du flux central de GR, δ l'épaisseur de la couche plasmatique et D le diamètre du vaisseau. Cette couche plasmatique, où se concentre le gradient de vitesse, facilite l'écoulement [COL 04]. Elle a principalement été étudiée par H.L. Goldsmith [GOL 68] et G.B. Thurston [THU 89]. Cette viscosité effective varie en fonction du diamètre du canal ; c'est l'effet Fåhræus-Lindqvist.

Par ailleurs, dans un embranchement localisé au niveau de cette couche appauvrie, les GR resteront dans le canal principal tandis que le plasma tendra à aller vers la bifurcation ; c'est l'effet Fåhræus network, appelé également écrémage du plasma. Ce phénomène justifie que l'hématocrite soit variable en différents endroits du réseau sanguin.

Une schématisation de ces écoulements dans le système vasculaire est proposée dans la Figure I.8 et illustre l'ensemble de ces phénomènes.

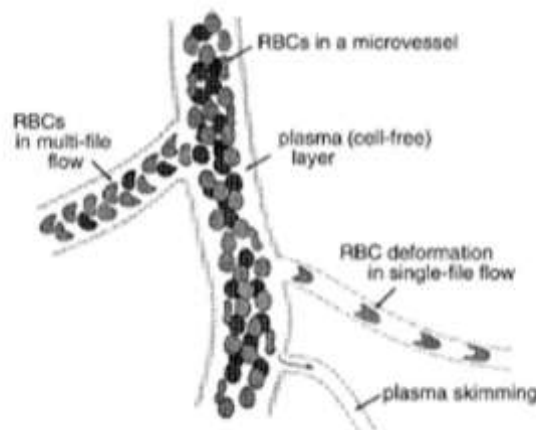


Figure I.8 : Ecoulement du sang dans les différents canaux du système vasculaire [MCH 01]. Une couche appauvrie en cellules (appelée « cell-free layer ») se forme sous l'effet de la migration latérale des GR dans les microvaisseaux et sous l'effet de leur déformation dans les capillaires. Certains embranchements permettent l'écrémage du plasma (appelé « plasma skimming »). L'hématocrite est donc variable d'un vaisseau sanguin à l'autre.

Comme nous le verrons dans le Chapitre 3, ce mécanisme de micro vascularisation est très utile en microsysteme pour séparer le plasma et les différents globules par de simples bifurcations géométriques [JAG 07].

B.2. GB, margination et cascade d'adhésion

B.2.1. Migration des GB vers les parois

Les GR, plus petits et plus souples que les GB, se déplacent plus vite. De plus, d'après le paragraphe précédent, ils tendent à rejoindre le centre du canal. Ces deux caractéristiques fluidiques encouragent les collisions entre GR et GB, qui forcent alors les GB à migrer vers les parois des vaisseaux et à initier leur roulement sur ces parois. Comme expliqué précédemment, ces problèmes de migration seront abordés dans le Chapitre.6. Ce processus sanguin s'appelle la margination des leucocytes [SHE 05, GOL 84] et sera utilisé dans le Chapitre 3 comme technique originale d'enrichissement d'un échantillon sanguin en GB.

Notons que, d'après [COL 07], l'hémodynamique n'est pas en mesure actuellement de distinguer les différentes catégories de GB pour décrire leur comportement dans l'écoulement.

B.2.2. Cascade d'adhésion et transmigration des GB

Ces deux phénomènes constituent des étapes du processus d'inflammation, qui est la réaction de défense suite à une blessure dans l'organisme. Ces étapes sont constituées d'une suite d'évènements qui mènent les GB de la veine vers le lieu de la blessure. Le schéma de la Figure I.9 illustre ces deux phénomènes.

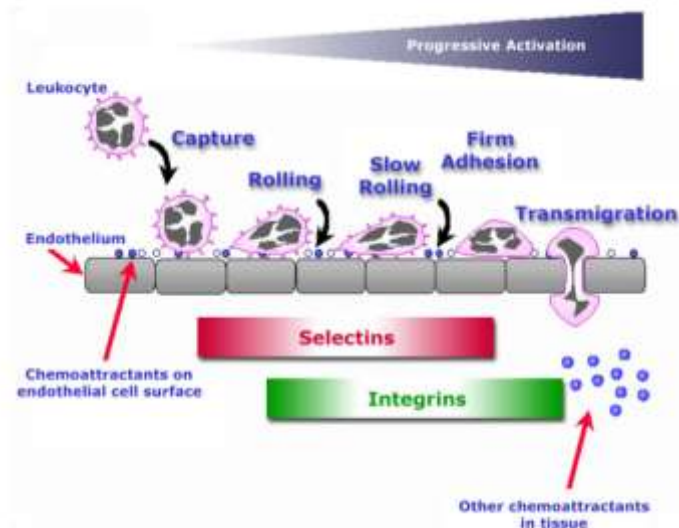


Figure I.9 : Schématisation de la cascade d'adhésion leucocytaire et de la transmigration. D'après www.chelationtherapyonline.com.

Les GB sont tout d'abord capturés par les Sélectines ; ils roulent sur la paroi de l'endothélium. Puis l'adhésion devient plus forte grâce aux Intégrines ; les membranes des GB s'activent, les GB se collent à la paroi, perdent leur forme sphérique et émettent des pseudopodes. Enfin, les GB traversent la membrane : c'est la transmigration [COL 07]. L'ensemble des molécules primaires d'adhésion mises en jeu successivement dans ce mécanisme vasculaire permet d'accrocher les GB, avec des liaisons plus ou moins fortes selon leur moment d'intervention dans la cascade : P-sélectine < L-sélectine < E-sélectine < Intégrine. Une description détaillée de ces molécules est présentée dans [VER 09].

L'interaction en flux du GB sur l'endothélium fait l'objet de nombreuses études, en particulier numériques, comme c'est le cas dans les publications de Duperray et col. [JIN 07].

B.3. Hémodynamique et pathologies

Les viscosités du sang et du plasma, ainsi que les propriétés rhéologiques des cellules sanguines (comme la déformabilité et l'agrégation des GR) sont fortement influencées par les pathologies. L'interaction entre les processus physiopathologiques et l'hémodynamique reste encore très mal connue [BAS 03]. L'écoulement sanguin reste un important sujet d'études, que ce soit dans des conditions physiologiques normales ou dans des conditions cliniques pathologiques [KU 97], afin d'en faciliter le diagnostic.

Une grande partie de ces études portent sur les maladies cardiovasculaires qui constituent la première cause de mortalité dans les pays développés. En effet, la plupart

de ces pathologies se caractérisent par des écoulements anormaux et caractéristiques [KU 97], avec généralement une augmentation de la viscosité du sang et de l'agrégation ainsi qu'une réduction de la déformabilité des GR [LED 89].

En particulier, citons l'exemple de la sténose dont l'hémodynamique est étudiée entre autre dans [KHA 81, KU 97 et TAN 08]. Comme illustré dans la Figure I.10.a, la sténose est le rétrécissement localisé d'une artère lié à la formation d'une plaque d'athérome. Cette plaque, qui réduit le diamètre intérieur de l'artère, est issue du dépôt de cholestérol LDL et de macrophages qui se transforment en cellules spumeuses et auxquelles s'ajoutent ensuite des cellules musculaires. Ce rétrécissement entraîne tout d'abord une diminution du débit en aval de la constriction. A plus long terme il peut conduire à un accident vasculaire.

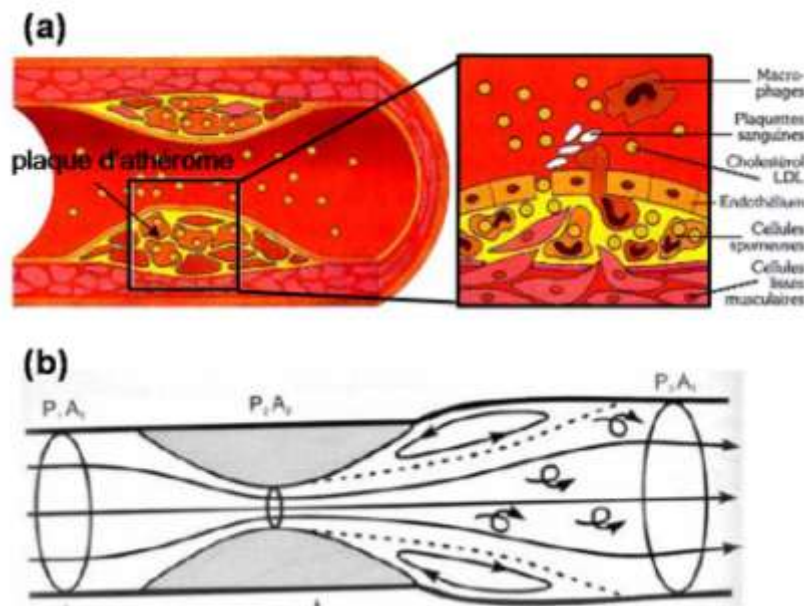


Figure I.10 : Principe de la sténose. (a) Schématisation de la sténose d'une artère, conséquence du dépôt d'une plaque d'athérome. D'après www.prevention.ch. (b) Schématisation de l'apparition de turbulences dans les régions post-sténotiques des vaisseaux sanguins. D'après www.wiki.nus.edu

Comme schématisé dans la Figure I.10.b, l'hémodynamique des sténoses se caractérise par l'apparition de recirculations dans la région d'expansion et dont l'ampleur est déterminée par le nombre de Reynolds en amont de la sténose. Nous verrons dans le Chapitre 6 comment il est possible de s'inspirer de cet écoulement pour le fractionnement sanguin.

B.4. Conclusion

Ainsi, nous avons pu voir dans ce Chapitre 1 la complexité de l'échantillon sanguin et son caractère non homogène. Les différents constituants du sang diffèrent entre eux par leur fonction et leur composition biologique, mais également par leurs dimensions, leur forme, leur proportion et leur écoulement dans le système vasculaire. Cette richesse de l'échantillon sanguin justifie les nombreuses analyses qui ont pour cibles ces constituants mais explique également qu'une préparation de l'échantillon soit souvent indispensable pour permettre l'analyse d'un élément donné. L'explication de cette démarche fait l'objet du chapitre suivant.

II. Du prélèvement sanguin à l'analyse

Comme expliqué dans le Chapitre 1, le sang est un liquide complexe représentatif de l'état physio-pathologique du patient. De nombreuses analyses sont effectuées sur les éléments sanguins mais le prélèvement est rarement traité tel quel. En effet, il nécessite la plupart du temps une étape de préparation préliminaire. Afin par la suite de justifier de l'intérêt d'une miniaturisation des appareils sanguins dans le Chapitre 3, il nous a paru nécessaire de tout d'abord se pencher sur les systèmes macroscopiques et leurs contraintes, d'autant plus que cette thématique était nouvelle au sein du laboratoire.

Dans ce but, ce chapitre présente le cheminement classique, du prélèvement de sang tout d'abord à son analyse ensuite, en passant par l'étape de la préparation de l'échantillon c'est-à-dire son fractionnement. Ce cheminement est illustré dans la Figure II.1.

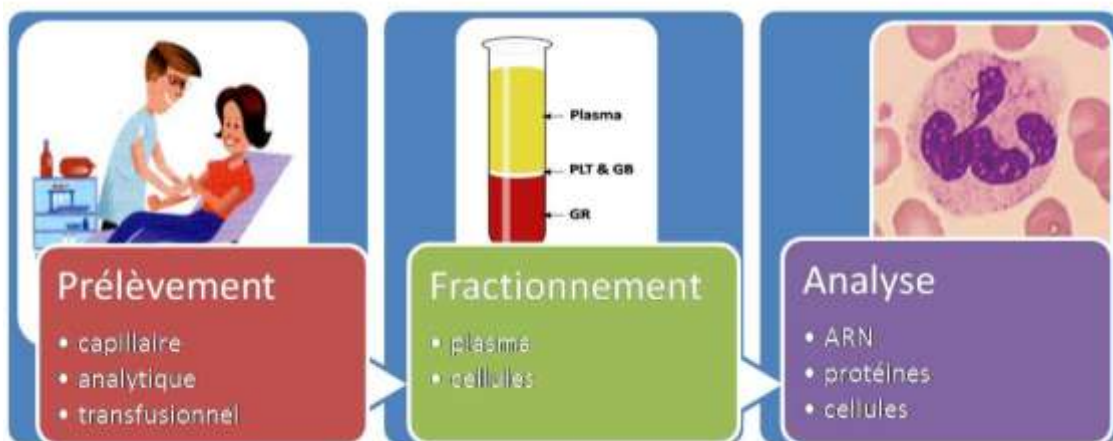


Figure II.1 : Schématisation d'une chaîne d'analyse d'échantillon sanguin, du prélèvement à sa préparation en vue de son analyse et de la détection associée.

A. Le prélèvement

Le prélèvement du sang d'un patient est la première étape de toute analyse sanguine, quelle qu'elle soit.

La technique de prélèvement choisie est fonction du volume de sang nécessaire. Il en existe deux catégories : Le prélèvement veineux (ou prise de sang) (5 à 50mL), se fait par un personnel médical spécialisé, à l'hôpital ou dans des laboratoires d'analyses. Le prélèvement capillaire (10 à 100µL) se fait grâce à une lancette qui permet de piquer le bout du doigt, au bout duquel une goutte de sang est alors prélevée. Il peut être réalisé par du personnel moins expérimenté ou par le patient lui-même en cas de suivi

quotidien. Le prélèvement capillaire est moins invasif que la prise de sang et beaucoup plus pratique, particulièrement lors de problèmes d'accessibilité aux veines*.

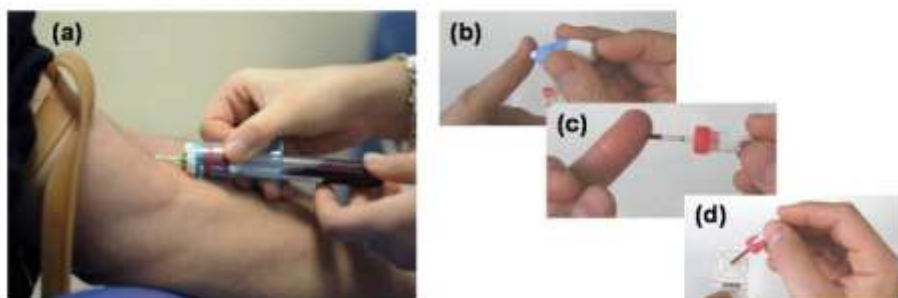


Figure II.2 : Illustration du prélèvement sanguin. (a) Prélèvement veineux ou prise de sang, d'après www.20minutes.fr. Le tube BD, sous vide, permet de contrôler l'aspiration du sang. (b, c, d) Prélèvement capillaire à l'aide d'une lancette BD puis dépôt de la goutte de sang sur un papier filtrant par exemple, d'après [ROS 08].

Il est important de noter que les échantillons sanguins extraits par ces deux types de prélèvement donnent des résultats différents aux analyses (concentrations protéiques par exemple) [BAS 03]. Pour avoir un volume d'échantillon suffisant lors d'un prélèvement capillaire, il est souvent nécessaire de masser voire d'appuyer sur le doigt. C'est douloureux et cela entraîne une variation de composition de l'échantillon. Le sang rencontre la barrière cellulaire, déclenchant une réaction de coagulation. Les analytes peuvent alors être modifiés par les molécules rencontrées. Alors que dans le cas du prélèvement veineux, le sang est prélevé par l'aiguille directement au milieu de la veine, sans jamais entrer en contact avec l'endothélium. Toutes ces raisons justifient l'utilisation du prélèvement veineux pour les analyses quantitatives et précises et celle du prélèvement capillaire pour des estimations moins cruciales.

Un autre paramètre important en faveur du prélèvement veineux est le volume de l'échantillon. La taille de l'échantillon (et donc la technique de prélèvement) est fixée en fonction de la concentration sanguine de la cible et du seuil de détection de la méthode d'analyse. Avec les progrès des méthodes de détection, la taille des échantillons a diminué de manière considérable ces dernières années. Ce n'est cependant pas le cas pour les cibles rares. Par exemple, le seuil de détection du virus HIV (Virus de l'Immunodéficience Humaine) est de 20 pathogènes pour 1mL de plasma. La réduction du volume de la prise initiale rend vite l'échantillon statistiquement non significatif (avec un impact important sur la précision de la mesure et sur le nombre de faux négatifs). Ainsi le volume de l'échantillon ne peut pas toujours être réduit, malgré des systèmes de détection devenus très sensibles. C'est pour cela que le prélèvement capillaire n'est généralement utilisé que pour les analyses sur des espèces concentrées (comme le glucose ou certaines protéines) et que le prélèvement veineux demeure habituel. Notons cependant que, malgré un volume de prélèvement important, seule une petite fraction de ce volume est utilisée au final, par exemple jusque 300µL pour une numération cellulaire à partir d'un tube EDTA (acide Ethylène Diamine Tétra Acétique) de 5mL.

* Les veines de certaines catégories de patients sont difficilement accessibles ; les enfants en particulier, certaines personnes âgées...

Dans le cadre du travail qui sera présenté ici, le volume d'intérêt est de 2mL environ. Le prélèvement se fera donc par prise de sang. Pour cela, le sang est récupéré dans des tubes placés sous vide et contenant des inhibiteurs de coagulation (tubes BD - Becton Dickinson - Vacutainer). Ces inhibiteurs sont généralement de l'EDTA, de l'Héparine ou du Citrate de Sodium, selon l'analyse faite ensuite [BD 08]: L'EDTA est l'anticoagulant de choix pour le comptage cellulaire mais également pour les dosages de médicaments, d'éléments toxiques, de marqueurs et d'hormones. C'est l'anticoagulant choisi pour le travail présenté ici. L'Héparine est quant à elle plus adaptée pour la culture cellulaire et la détermination chimique du plasma tandis que le Citrate de sodium* est utilisé pour les études de coagulation et d'hémostase.

Enfin, un autre point critique à noter pour l'étape de prélèvement est le temps qui s'écoule entre le prélèvement et l'analyse. Selon son mode de stockage, le sang continue d'évoluer dans le tube de prélèvement, entraînant une dégradation des ARN, des protéines et une modification de l'expression des cellules sanguines. Suivant les applications, ces conditions de stockage difficilement reproductibles représentent une des causes de variabilité les plus importantes dans les analyses. On voit donc ici tout l'intérêt d'un système portable qui ferait l'analyse aussitôt après le prélèvement ou encore d'un dispositif qui intégrerait la stabilisation de l'échantillon avant son stockage.

B. Le fractionnement sanguin

La préparation d'échantillon sanguin étant une nouvelle thématique pour le laboratoire, il a été nécessaire, au début de ce travail de thèse, de faire un état de l'art des techniques existantes. Pour cela, nous avons rencontré des personnes du métier et visité certains laboratoires ou centres transfusionnels (D^r Mossuz du laboratoire d'Hématologie de Michallon, D^r Martre et D^r Morand du CTS de Grenoble, M^{me} Fournel du CTS de Saint-Ismier ainsi que M^{me} Lucas du Département de Biologie Intégrée).

L'état de l'art sur le fractionnement sanguin est un sujet très vaste et les techniques utilisées sont très variables. Elles peuvent être divisées en trois grandes parties selon le volume de sang prélevé et l'utilisation qui va en être faite. On distingue ainsi le fractionnement transfusionnel (500mL), le fractionnement analytique pour les analyses en laboratoire (5-50mL) et le fractionnement en microsystème (quelques μ L-3mL) qui, lui, sera abordé par la suite.

B.1. Le fractionnement transfusionnel et l'aphérèse

Le fractionnement sanguin transfusionnel est utilisé en vue de l'aphérèse. C'est une technique médicale extracorporelle où le sang du patient circule dans une machine, le but étant de supprimer un composant sanguin. Puis le sang appauvri repart en circulation pour être réinjecté dans l'individu. Il existe plusieurs types d'aphérèse, selon l'élément sanguin extrait: la plasmaphérèse pour l'extraction du plasma et la cytophérèse pour l'extraction des cellules. L'aphérèse se fait pour le don du sang, où

* Cet anticoagulant est un additif liquide, qui entraîne par conséquent une dilution de l'échantillon dont il faut tenir compte (1 volume de citrate pour 9 volumes de sang), contrairement aux deux anticoagulants précédents qui sont à l'état de fines gouttelettes déposées sur les parois du tube.

certaines constituants du sang donneur sont récupérés pour être réinjectés chez un autre patient (généralement les plaquettes et le plasma, plus rarement les leucocytes afin d'aider à combattre certaines infections). L'aphérèse se fait également dans un but thérapeutique, quand il est nécessaire de supprimer un composant sanguin responsable d'une maladie. Le sang traité est alors réinjecté dans le même individu. Cette aphérèse se fait sur le plasma (pour y enlever des complexes immuns, des anticorps circulants ou des protéines en excès) alors remplacé par une solution saline, mais également sur les plaquettes (quand la concentration est trop élevée lors d'une thrombocytose) ou sur les leucocytes (en excès dans les cas de leucémies).

Suivant l'élément à supprimer, la méthode d'aphérèse varie. La méthode la plus classique est la centrifugation. D'autres méthodes, plus récentes, utilisent les membranes filtrantes avec ou sans adhésion sur colonne. Ces deux grandes familles de techniques sont rapidement présentées ici. Un très bon aperçu des techniques d'aphérèse actuelles a été proposé par BG Stegmayr dans [STE 05].

B.1.1. La centrifugation transfusionnelle

La centrifugation est la technique utilisée dans le fractionnement sanguin transfusionnel. Le bol est l'un des dispositifs les plus anciens de fragmentation en flux continu (Figure II.3.a). Le sang complet est introduit dans une chambre mise en rotation par une centrifugeuse. La forme conique permet une séparation haut/bas des différents globules et facilite l'extraction. Un système d'aspiration permet d'éliminer sélectivement le composant non désiré. Les systèmes transfusionnels ont depuis fortement évolué mais le principe reste le même (Figure II.3.b et c). La centrifugation se fait dans une poche jetable et plate. Les différents constituants sont récupérés par des systèmes de tubulures (également jetables), la partie restante étant réinjectée dans le patient. La partie tubulure est très complexe et comprend entre autres des capteurs de pression, des capteurs de présence des GR, des valves, le tout étant piloté par un logiciel d'interface utilisateur. Dans le dispositif Cobe (Figure II.3.d), l'action combinée d'un fluide hydraulique sur une membrane flexible permet de contrôler finement la localisation du plasma ou des cellules dans le sac préfixé (jetable encore une fois).

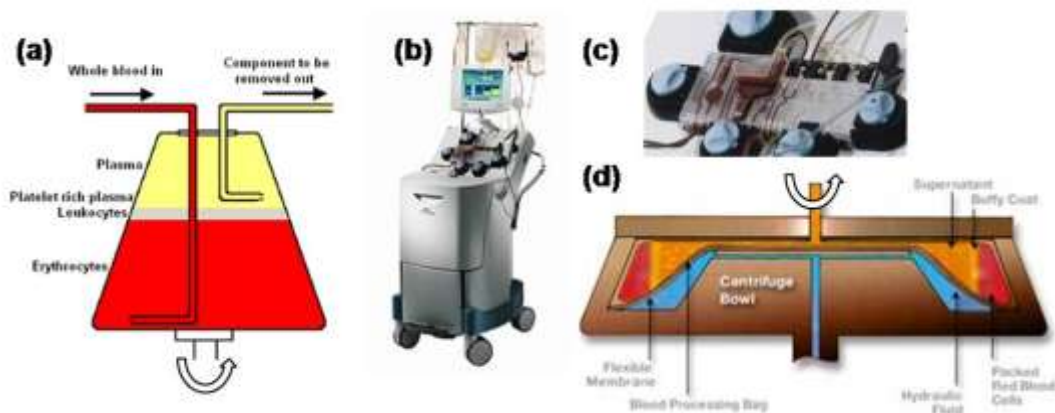


Figure II.3 : Illustrations de la centrifugation transfusionnelle, d'après www.caridianbct.com. (a) Technique traditionnelle du bol. (b) Encombrement et complexité des systèmes actuels, ici le Trima Accel Collection de Caridian BCT et ses tubulures jetables (c). (d) Principe de fonctionnement du dispositif Cobe, le bol des temps modernes réactualisé par Caridian BCT.

Tous ces automates commerciaux sont très complexes, volumineux et coûteux. Par ailleurs, comme le sang qui traverse les consommables est réinjecté dans le patient, ceux-ci sont à usage unique et à la pointe de la technologie en terme de biocompatibilité. Ils sont donc également onéreux (150 euros le kit pour une transfusion). Mais le grand intérêt de ces systèmes est leur fonctionnement sur une longue durée (presque 2h), sans avoir besoin de diluer le sang.

B.1.2. Les membranes filtrantes

La filtration permet d'isoler des éléments ciblés par l'utilisation de pores de diamètre variable. Le mécanisme physique utilisé ici est donc l'exclusion par taille. Le paramètre qualifiant la sélectivité d'une membrane filtrante est la dimension de ses pores et sa clairance, un coefficient représentant sa capacité à éliminer une substance donnée. Dans le cas du sang, la clairance s'exprime par le poids moléculaire des molécules qui passent à travers les pores. A titre d'exemple, Créatinine : 113Da, Albumine : $66,4 \cdot 10^3$ Da, Anticorps (IgG) : $150 \cdot 10^3$ Da. La filtration d'aphérèse est généralement combinée à de l'adsorption, qui permet une suppression sélective de certaines cellules ou protéines, le plus souvent par adsorption physico-chimique ou biologique.

Citons par exemple le Plasmaflo (Asahi Kasei Medical) qui est la technique de référence pour la séparation du plasma, très utilisée dans les hôpitaux (Figure II.4.a). Elle fonctionne grâce à une membrane de cellulose di acétate ayant des pores de $0,2\mu\text{m}$ de diamètre, qui autorisent une clairance de $3 \cdot 10^6$ Da, pour un volume total de 65mL. Le Sepacell, lui, extrait les GB grâce à deux filtres placés en série faits de fibres tissées ; le premier permet un filtrage grossier des agrégats cellulaires puis le second absorbe les GB (Figure II.4.b). Le Cellsorba est fondé sur le même principe mais utilise une colonne représentée Figure II.4.c : les GB restent sur les membranes traversées tandis que la phase liquide traverse la colonne vers le centre pour ensuite en sortir. Le Cellsorba permet de filtrer 3-4L à un débit de 50mL/min. Il perd de son efficacité au cours du temps, efficacité qui n'est pas la même pour tous les types de leucocytes, comme illustré sur le graphe de la Figure II.4.c.

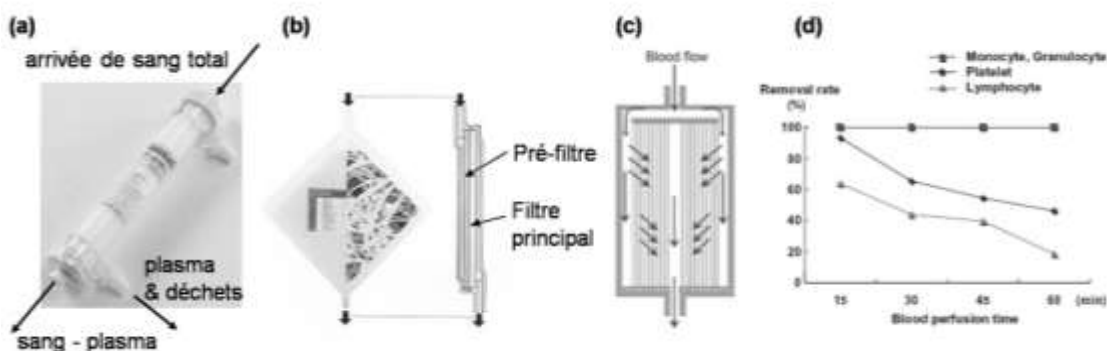


Figure II.4 : Membranes filtrantes et transfusion, d'après www.asahi-kasei.co.jp. (a) Photographie du Plasmaflo pour lequel le flux principal reste au centre, tandis que le plasma traverse les pores latéraux. (b) Principe du filtre à GB Sepacell et passage du flux sanguin par les deux filtres. (c) Principe de fonctionnement du Cellsorba. (d) Efficacité au cours du temps de perfusion sur l'extraction des différents types de leucocytes.

B.2. Le fractionnement analytique

Par rapport au fractionnement transfusionnel, les techniques de séparation restent globalement les mêmes, c'est-à-dire la centrifugation et la filtration, mais pour des volumes traités inférieurs.

B.2.1. Centrifugation & Buffy Coat

La centrifugation est encore une fois le moyen de séparation le plus répandu et le plus efficace pour les tubes de prélèvement d'analyse. Le fractionnement se fait avec différentes variantes, selon l'analyte récupéré. Par exemple, une centrifugation simple suffit pour récupérer le plasma (5min à 1500g).

Pour les GB c'est beaucoup plus complexe. Comme expliqué précédemment dans le Chapitre 1, les GB forment un anneau hétérogène localisé entre le plasma et les GR, c'est le Buffy Coat (Figure II.5.a et b). Les GB étant mille fois moins nombreux que les GR, cette couche fine est difficile à extraire telle quelle, et nécessite la dextérité d'un personnel spécialisé. Pour faciliter cette extraction il existe des gels, comme le Ficoll ou le tube CPT (Cell Preparation Tube) de BD (Figure II.5.c), ayant une densité intermédiaire entre celles des GB et des GR afin de permettre une différenciation accentuée des éléments. Ces méthodes prennent beaucoup plus de temps et nécessitent des étapes supplémentaires de lavage, surtout si l'on veut un échantillon final pur (3h pour un Ficoll classique manuel, 20min pour un tube BD CPT).



Figure II.5 : (a, b) Centrifugation et mise en évidence du buffy coat, d'après www.caridianbct.com. (c) Photographie d'un tube CPT de BD montrant les différentes strates d'un échantillon sanguin après centrifugation, d'après www.bd.com.

B.2.2. La lyse sélective

Une autre technique utilisée très fréquemment pour l'extraction des GB dans les laboratoires d'analyses est la lyse sélective des globules rouges. La lyse est la réponse des cellules à un choc osmotique : quand la pression osmotique extérieure à la cellule diminue (c'est-à-dire que l'osmolarité de la solution est plus faible), la cellule gonfle jusqu'à la limite de son élasticité (Figure II.6). La membrane ouvre alors un ou

plusieurs pores afin de rétablir l'équilibre osmolaire intérieur/extérieur. Les GR sont très fragiles au choc osmotique, les GB un peu moins. Pour récupérer les GB, il faut contrôler précisément l'osmolarité du tampon et son temps de contact avec les cellules, afin de lyser sélectivement les GR avec le moins de perturbations possibles sur les GB.

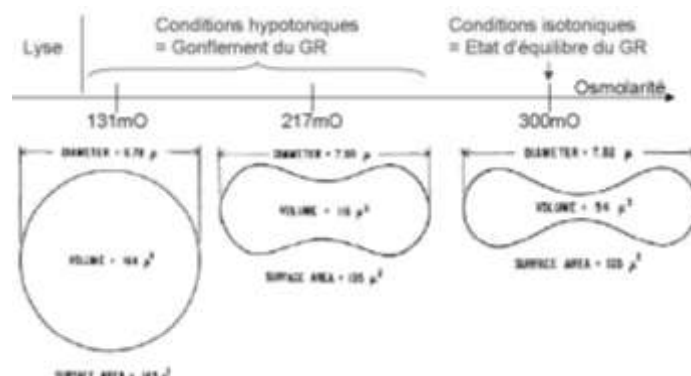


Figure II.6 : Evolution de la forme du GR en fonction de l'osmolarité du tampon. Sur la base d'une figure d'Evans et col. [EVA 72].

Cette lyse peut se faire directement avec de l'eau, dès 8sec pour les GR, à partir de 35sec pour les GB. Les tampons de lyse commerciaux ont l'avantage de proposer une lyse plus « douce », à l'aide d'agents fixants censés permettre une stabilisation des GB. Ils garantissent ainsi une lyse optimale des GR tout en gardant intacts les GB. Ce protocole peut dans certains cas s'appliquer directement sur un Buffy Coat afin d'éliminer les GR résiduels.

B.2.3. La filtration Leukolock

Le système filtrant Leukolock (LeukoLOCK Total RNA Isoaltion System, Ambion) est également une technique de référence dans l'extraction des GB en vue d'analyses génomiques. Le système propose, à partir d'un tube de sang humain non dilué, une extraction des GB dans le filtre circulaire montré Figure II.7. Le protocole se fait de la façon suivante : le sang passe dans le filtre LeukoLock grâce à un tube d'évacuation qui est sous vide, les GB sont retenus dans le filtre traversé, puis rincés. L'injection d'un tampon de lyse permet de lyser les GB et d'en éluer les débris pour ensuite en extraire l'ARN, à l'aide de billes fonctionnalisées par exemple. Le moteur fluide de cette filtration est la différence de pression entre les deux tubes BD utilisés. Il est difficile de définir un rendement d'extraction des GB car ceux-ci restent dans le filtre et c'est leur contenu qui est récupéré et dosé.

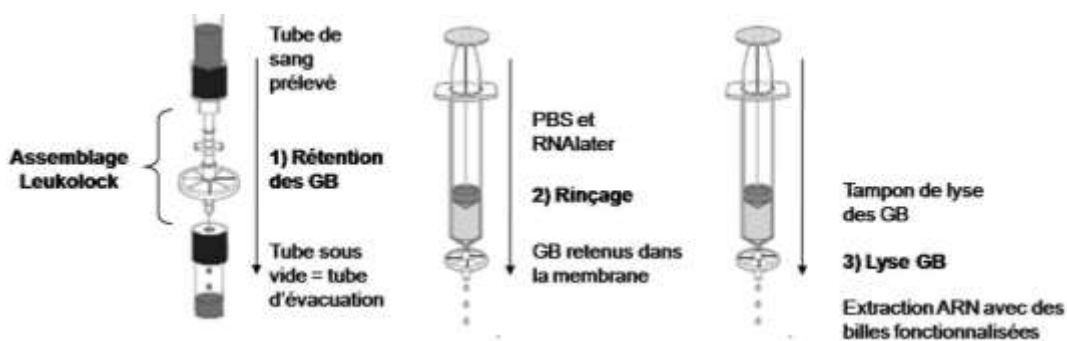


Figure II.7 : Description du système filtrant Leukolock de Ambion, d'après www.ambion.com.

B.2.4. Les billes magnétiques fonctionnalisées

La fonctionnalisation de billes magnétiques avec des anticorps dirigés contre des cellules cibles s'avère très efficace, rapide, et de plus en plus utilisée. Cette technique, caractérisée par une très forte spécificité, est nommée MACS (Magnetic Cell Sorting). Les billes magnétiques de Dynal Invitrogen sont une référence dans ce domaine et ciblent l'ensemble des cellules sanguines [DYN 06]. Le principe de fonctionnement est présenté Figure II.7.b et fera l'objet d'une description plus approfondie dans le Chapitre 3.

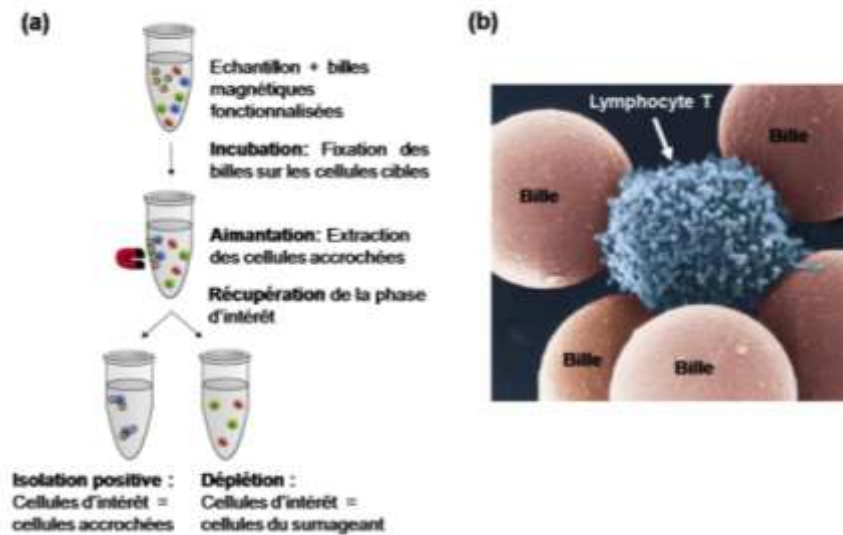


Figure II.8 : Isolation positive et déplétion de cellules cibles par l'utilisation de billes magnétiques fonctionnalisées, d'après www.dynal.com. (a) Modification d'un schéma de principe Dynabeads. (b) Exemple d'isolation positive d'un lymphocyte T accrochés sur des billes Dynabeads de 4,5µm de diamètre.

B.3. Conclusion

Pour résumer, que ce soit en volume transfusionnel ou analytique, il existe globalement deux grands principes de fractionnement des éléments du sang : la centrifugation et la filtration, qui permettent une séparation soit par le poids soit par la taille. Nous verrons par la suite que ces principes se retrouvent également en microsystème, avec cependant l'utilisation de principes supplémentaires rendus possibles par la miniaturisation des dimensions.

L'extraction du plasma se fait relativement simplement par centrifugation, qui sera la technique de référence pour la suite. Par contre, l'extraction des GB apparaît comme l'étape la plus complexe, quelque soit le principe et le volume ciblé. Afin d'avoir une méthode de référence simple, ces techniques analytiques d'extraction des GB ont été testées et comparées. Cette comparaison expérimentale est disponible en Annexe 1.

C. L'analyse

L'échantillon sanguin est l'échantillon biologique le plus représentatif de l'état physiopathologique du patient. Par ailleurs, son prélèvement est relativement simple et peu douloureux au regard des biopsies tissulaires. Ces arguments en font un échantillon idéal pour de nombreuses analyses. Un très grand nombre de tests se font sur le sang, en routine ou de manière plus épisodique pour l'établissement d'un diagnostic bien ciblé, dans un but de diagnostic ou pour un suivi de traitement. Le but ici n'est pas de dresser une liste exhaustive des analyses sanguines, mais juste d'en présenter quelques unes, pour chaque composant du sang. La plupart des informations présentées ici sont issues du livre d'hématologie de Barbara Brown [BRO 93] et du site internet www.vulgaris-medical.com.

Tout d'abord citons l'hémogramme, qui se fait en routine dans tous les laboratoires médicaux. C'est l'examen sur sang total le plus couramment pratiqué sur un prélèvement veineux. Il est réalisé avec des appareils automatisés, avec toutefois le recours à un examen microscopique dès qu'une anomalie éventuelle est détectée par l'appareil. L'hémogramme est constitué de deux types d'analyses : premièrement une analyse morphologique, réalisée à l'aide de frottis automatisés (l'appareil étale l'échantillon sur la lame, la colore et fait l'analyse par traitement d'images de l'observation), deuxièmement une analyse quantitative, appelée également numération formule sanguine (NFS), réalisée par des cytomètres en flux. Elle renseigne sur la concentration des différents types cellulaires (GR, GB, PLT et souvent également des différents GB) ainsi que le taux d'Hb, l'hématocrite* (Ht), la concentration moyenne des GR en Hb et le volume globulaire moyen. Le Tableau II-1.a donne un exemple des valeurs attendues pour la numération sanguine d'un patient sain de sexe masculin.

(a)		Données	Valeurs attendues
		Hémoglobine (Hb)	13 - 18 g/dL
		Erythrocytes (GR)	$4,5 - 6,10^6/\mu\text{L}$
		Hématocrite (Ht)	40 - 54 %
		Volume globulaire moy. (VGM)	85 - 95 fL ou μm^3
		Concentration corpusculaire moy. en Hb (CCMH)	32 - 36 g/dL
		Teneur corpusculaire moy. en Hb (TCMH)	27 - 31 pg
Leucocytes (GB)	Granulocytes neutrophiles	$1,7 - 7,5 \cdot 10^3/\mu\text{L}$	
	Granulocytes éosinophiles	40 - 300/ μL	
	Granulocytes basophiles	< 50/ μL	
	Lymphocytes	$1 - 4 \cdot 10^3/\mu\text{L}$	
	Monocytes	$0,2 - 1 \cdot 10^3/\mu\text{L}$	
		Plaquettes (PLT)	$150 - 400 \cdot 10^3/\mu\text{L}$

(b)		Données	Valeurs attendues
Protéine	Transferrine		2 - 3,6 g/L
	Cholestérol		1,3 - 2 g/L
Bilan lipidique	Triglycérides		0,04 - 2 g/L
	Cholestérol HDL		0,65 - 1,2 g/L
	Cholestérol LDL		0,5 - 1,6 g/L
Enzymologie	ASAT		10 - 35 U/L
	ALAT		10 - 35 U/L
	γ GT		5 - 36 U/L
Chimie biologique	Urée		0,1 - 0,5 g/L
	Créatininémie		5 - 9 g/L
	Acide urique		24 - 57 mg/L
	Glycémie		0,74 - 1,06 g/L
	Fer sérique		37 - 145 $\mu\text{g}/100\text{mL}$
	Ferritine		15 - 150 $\mu\text{g}/\text{L}$

Tableau II-1 : Bilan sanguin classiquement réalisé en laboratoire. (a) Résultats attendus pour un hémogramme effectué sur un homme adulte et (b) autres analyses.

* L'hématocrite est le pourcentage exprimant le rapport du volume des GR sur le volume total de sang.

C.1. Le plasma

La composition détaillée du plasma, présentée précédemment dans le Tableau I-1, justifie qu'une grande quantité d'analyses se fassent à partir du plasma.

Au cours des bilans sanguins classiquement réalisés en laboratoires, l'hémogramme présenté dans le Tableau II-1.a est généralement complété par une analyse de chimie biologique (comme le dosage de l'urée, la glycémie ou le fer), un bilan lipidique (avec le dosage du cholestérol) et une étude enzymologique (avec le dosage des transaminases). Lors d'un don du sang, le plasma du donneur est également qualifié à l'aide d'une sérologie* virale, qui permet de déterminer la présence ou non de virus transmissibles au receveur (tels que le VIH, les hépatites B et C, le CMV, le HTLV, la syphilis et le paludisme).

Dans le domaine de la recherche, une application fondamentale est l'analyse protéomique pour l'identification de nouveaux biomarqueurs. Ces études, réalisées directement sur plasma ou sérum plutôt que sur sang complet, ont pour objectif la mise en évidence au spectromètre de masse de marqueurs spécifiques pour le diagnostic et le pronostic de certaines maladies [MEN 07, ADK 02]. Ces marqueurs étant en très faible concentration dans le plasma, ces études nécessitent des étapes supplémentaires dans la préparation de l'échantillon [MEN 07] ; la suppression des protéines majoritaires (car 22 protéines constituent 99% du contenu protéique du plasma, dont 50% pour l'albumine).

C.2. Les globules rouges

Le test sanguin réalisé en routine sur les GR consiste en l'identification du groupe sanguin (ABO). Le principe est illustré dans le Tableau II-2. Les GR possèdent sur leur membrane des antigènes appelés agglutinogènes. Il y a les antigènes A et B, dont la présence définit les groupes A, B ou AB tandis que leur absence définit le groupe O. De plus, un individu possède dans son plasma des anticorps, appelés les agglutinines, complémentaires des antigènes de ses GR (un groupe A aura des anticorps anti-B). Lorsque les GR d'un donneur marqué A rencontrent les anticorps anti-A d'un receveur, les GR s'agglutinent les uns aux autres, formant des paquets plus ou moins gros qui vont bloquer la circulation dans les vaisseaux sanguins. Ce phénomène d'agglutination justifie l'importance d'une détermination correcte du groupe sanguin lors des transfusions. Cette analyse doit être facile, fiable et rapide.

Les pathologies des GR (appelées de façon générale anémies) sont principalement fondées sur une malformation de la molécule d'Hb ou sur une altération de la membrane ou du cytosquelette du GR [BRO 93]. Il en résulte presque toujours une modification de leur morphologie. C'est pourquoi le diagnostic des anémies se fait principalement sur sang complet par l'étude de la forme et de l'aspect des GR (à l'aide de frottis) et par l'étude de l'Hb qu'ils contiennent.

*La sérologie est l'étude du sérum et la mise en évidence des indices de présence (à l'instant présent ou par le passé) de pathogènes dans l'organisme. Cette étude se fait au moyen de différents tests, comme le dosage d'anticorps spécifiques. VIH = virus de l'Immunodéficience humaine, VHB et VHC = virus des hépatites B et C, CMV = cytomégalovirus, HTLV = virus T-lymphotropique humain.

	Groupe A	Groupe B	Groupe AB	Groupe O
Globule Rouge				
Anticorps	 Anti-B	 Anti-A	Aucun	 Anti-A et Anti-B
Antigène	Antigène A	Antigène B	Antigène A et B	Pas d'antigène

Tableau II-2 : Marqueurs de groupes sanguins et système ABO. D'après www.fr.wikipedia.org.

On peut citer rapidement deux exemples de diagnostic morphologique parmi les plus connus : le paludisme (appelé également malaria) et la drépanocytose. Le pathogène du paludisme vit dans les GR, leur donnant un aspect granuleux caractéristique. Lorsque les GR sont infectés, ils adhèrent aux parois des vaisseaux, libèrent l'hémoglobine qu'ils contiennent et bloquent ainsi le flux de l'oxygène dans l'organisme (Figure II.9.a). Dans le cas de la drépanocytose (appelée également anémie falciforme), une malformation des molécules d'Hb conduit à une déformation des GR, qui n'ont plus la forme d'un disque mais celle, caractéristique, d'une faucille (Figure II.9.b et c). Moins souples, ils restent bloqués dans les capillaires sanguins où ils provoquent l'arrêt de l'irrigation de la zone concernée.

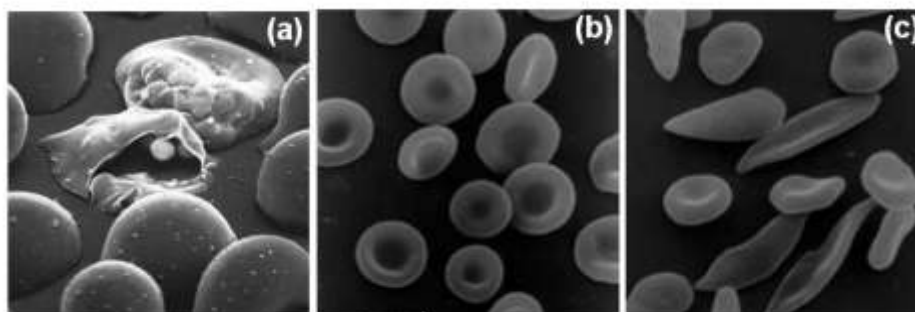


Figure II.9 : Quelques exemples de pathologies GR. (a) Photographie d'un GR après infection par la malaria. Photographie extraite de www.biology.ecsu.edu. (b, c) Photographies extraites de www.fr.wikipedia.org. (b) GR d'un patient sain. (c) GR d'un patient atteint de drépanocytose.

C.3. Les plaquettes

On distingue trois types de pathologies plaquettaires : une diminution des fonctions plaquettaires (ou thrombopathie) est une anomalie qualitative, ou fonctionnelle, tandis qu'une augmentation ou une diminution du taux de PLT (respectivement thrombocytose et thrombopénie) sont toutes les deux des anomalies quantitatives. Pour détecter ces différentes pathologies, les examens plaquettaires sont les suivants :

✓ *le frottis*. Il renseigne sur la morphologie des PLT. En effet, dans le cas des thrombopathies, l'altération de la qualité des PLT se traduit par une modification de leur forme, avec un taux de PLT souvent normal, comme illustré dans la Figure II.10.

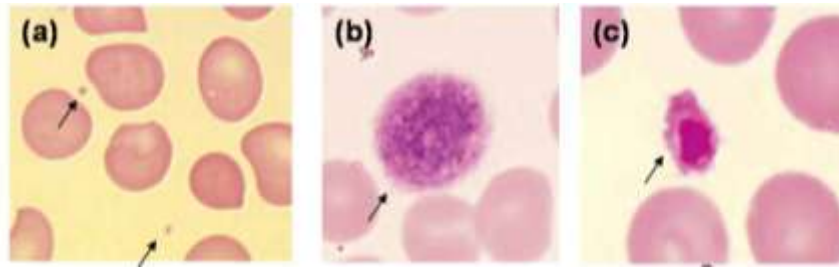


Figure II.10 : Quelques exemples d'anomalies plaquettaires. Observation de frottis au microscope [FEN 06]. (a) PLT de petite taille, syndrome de Wiskott-Aldrich. (b) PLT géantes, syndrome de Bernard Soulier. (c) PLT pourvues d'un granule géant, thrombopénie Paris-Trousseau.

✓ *l'étude indirecte de leur capacité fonctionnelle*. Une anomalie des fonctions plaquettaires est confirmée par une étude de l'agrégation des PLT et la mesure du temps de saignement (c'est-à-dire le temps mis par le sang pour coaguler après une incision faite au lobe de l'oreille).

✓ *la numération plaquettaire*. La numération des PLT est une étape difficile, car elles ont tendance à s'agglutiner ou au contraire à se fragmenter, entraînant des variations selon les méthodes et les laboratoires. La thrombopénie consiste en une diminution du nombre de PLT en dessous de $150.10^3/\mu\text{L}$. Elle entraîne principalement un risque hémorragique. La thrombocytose est, quant à elle, une augmentation du taux de PLT au dessus de $400.10^3/\mu\text{L}$. Elle est à l'origine d'un risque de thrombose par formation d'agrégats de PLT qui provoquent une obstruction vasculaire veineuse ou artérielle.

C.4. Les globules blancs

Les GB protègent l'organisme contre les agressions, ils sont donc fortement représentatifs de l'état pathologique du patient. Leurs anomalies sont diverses, quantitatives ou qualitatives, et peuvent toucher une ou plusieurs lignées. Les méthodes les plus communes de diagnostic sont le comptage global et par catégories (la numération) et le frottis :

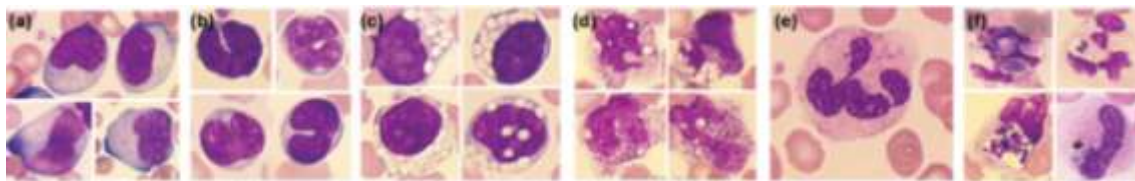


Figure II.11 : Quelques exemples d'anomalies leucocytaires. Observation de frottis au microscope [FEN 06]. (a, b, c) Anomalies des lymphocytes. (a) Lymphocytes de grande taille ; syndrome de la mononucléose. (b) Petits lymphocytes aux noyaux fendus ; syndrome de la coqueluche. (c) Lymphocytes vacuolés avec des vacuoles larges et multiples ; maladie de Landing. (d, e, f) Anomalies des neutrophiles. (d) Neutrophiles avec vacuoles et granulations toxiques ; infection bactérienne sévère. (e) Neutrophiles à double noyau ; salmonellose. (f) Levures, bactéries et parasites phagocytés par les neutrophiles.

✓ *la morphologie*. Au cours des infections (virales, bactériennes ou parasitaires), la mise en jeu des réactions immunitaires entraîne très souvent des changements morphologiques des GB. Une modification de cette morphologie peut également révéler des maladies génétiques. Dans l'ensemble de ces cas, la méthode de diagnostic est le frottis. La Figure II.11 illustre quelques unes de ces modifications morphologiques leucocytaires qui aident à définir la pathologie du patient.

✓ *la concentration*. Le taux des différents GB reflète l'état inflammatoire du patient, ce qui justifie entre autre que les concentrations des GB soient vérifiées en routine lors d'un don du sang. En effet, un excès de lymphocytes peut par exemple indiquer une infection contractée récemment et rendre dans ce cas le sang non transfusable.

✓ *le contenu génomique*. Les GB sont des cellules contenant un noyau et un cytoplasme. En conséquence, ils comportent de l'ARN messager (ARNm) et de l'ADN génomique (ADNg) dont l'analyse nécessite une isolation préliminaire des GB afin d'éviter toute contamination. Dans [SET 06], Sethu et al. analysent l'ARNm pour une évaluation directe de l'expression de gène des GB, en vue du développement de régimes de traitements personnalisés pour le patient. Dans [YOB 06], l'extraction de l'ADNg des GB a pour but l'identification rapide d'un suspect sur une scène de crime.

✓ *les antigènes*. Les GB sont également extraits et analysés pour leurs marqueurs antigéniques, c'est-à-dire les antigènes membranaires qu'ils expriment à leur surface. C'est le cas par exemple des marqueurs CD4+ et CD8+ exprimés par les lymphocytes T lors d'une contamination par le HIV [CHE 07].

C.5. Conclusion

Le sang fait l'objet de nombreuses analyses diverses et variées, en routine dans les laboratoires d'analyses ou de façon plus exotique dans des laboratoires de recherche, sur des petits ou sur des gros volumes, sur le contenu du plasma, sur les PLT, les GR ou les GB. Chaque constituant du sang a son intérêt et est objet d'analyses. Dans le cadre de ce travail, on s'intéressera en particulier au plasma pour les études protéiques et aux GB pour les analyses génomiques.

De façon générale, la plupart de ces analyses se font en laboratoires spécialisés, à l'aide d'automates de taille importante (difficilement transportables dans le cas des systèmes de transfusion), et avec la nécessité d'un personnel qualifié. En effet, dans le cas des frottis, les automates d'hématologie identifient les populations saines mais signalent par des alarmes les éventuelles anomalies morphologiques. Une observation au microscope réalisée par un personnel dédié est ensuite nécessaire au bon diagnostic car les automates actuels ne permettent pas de détecter la majorité des anomalies morphologiques. La miniaturisation de ces appareils d'analyse correspond donc à un réel besoin.

D. Conclusion : de l'état de l'art macroscopique à l'expression d'un besoin

Différents points bloquants sont apparus au cours de la description de la préparation macroscopique de l'échantillon sanguin. Les points essentiels sont récapitulés dans la Figure II.12 :

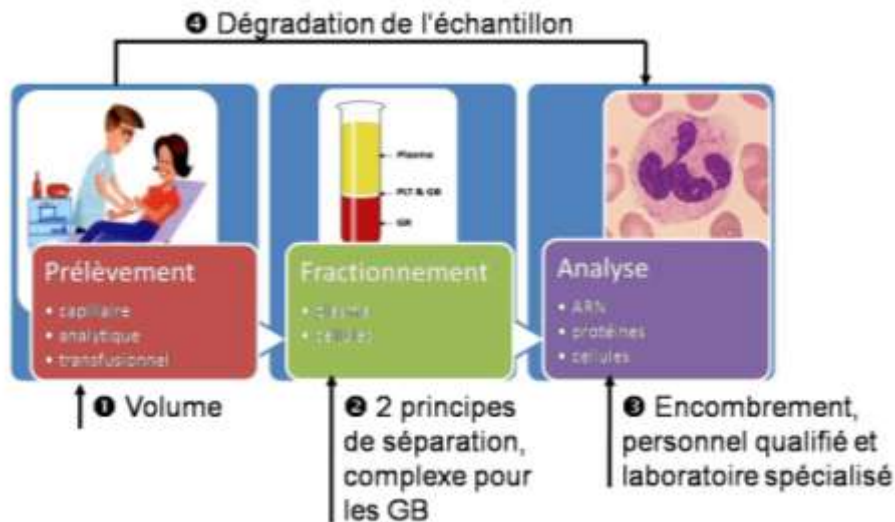


Figure II.12 : Préparation macroscopique de l'échantillon sanguin et positionnement des points bloquants en vue de l'expression du besoin.

❶ Le volume de prélèvement : Il a été montré dans ce chapitre que le volume de l'échantillon ne peut pas toujours être réduit, malgré des systèmes de détection devenus très sensibles. Ce point définit le paradoxe des microsystèmes, dont on vante généralement les mérites en vue du traitement de petits volumes alors que, pour certaines applications, un microsystème adapté à des volumes plus importants serait plus pertinent. Or il semble y avoir peu de méthodes intégrées commerciales permettant ce fractionnement sanguin en microsystème sur des volumes de sang non dilués de 1 à 2mL.

❷ Le fractionnement : Que ce soit en volume transfusionnel ou analytique, il n'existe globalement que deux grands principes de fractionnement des éléments du sang : la centrifugation et la filtration, pour une séparation par le poids ou par la taille. Cependant la miniaturisation des dimensions devrait rendre possible l'utilisation de principes supplémentaires. Notons ici que l'extraction des GB est apparue comme une étape complexe, quels que soient le principe et le volume ciblé, et qu'il est par conséquent prévisible que cela reste un défi en microsystème.

❸ Les automates d'analyse : De façon générale, la plupart des analyses se font en laboratoires spécialisés, à l'aide d'automates de taille importante et d'un environnement médical important et qualifié. La miniaturisation de ces appareils d'analyse permettrait de simplifier leur mise en œuvre afin de décentraliser le diagnostic, dans le cabinet du médecin ou au chevet du malade.

④ La dégradation de l'échantillon entre le prélèvement et l'analyse : Ce problème a été introduit précédemment et représente une cause de variabilité importante dans les analyses. On voit donc ici tout l'intérêt d'un système portable qui ferait l'analyse immédiatement après le prélèvement ou qui intégrerait la stabilisation de l'échantillon. L'intégration de la séparation et de l'analyse dans un même dispositif permettrait de raccourcir et d'homogénéiser le délai d'attente entre ces deux étapes, donc également d'améliorer la sensibilité et la reproductibilité de l'analyse.

Ainsi cet état de l'art aux échelles macroscopiques a permis, dans un premier temps, de se familiariser avec les techniques existantes et leurs contraintes puis, dans un second temps, d'établir de façon plus précise un besoin. Il s'agira donc de développer un système automatisé et miniaturisé pour rendre l'étape essentielle de la préparation d'échantillon sanguin plus reproductible, en stabilisant les analytes dès leur séparation ou en lui couplant le système d'analyse, avec un volume adapté à l'analyse ciblée.

Partie 2 : Microsystèmes

pour le sang

***L**e Chapitre 3 introduit les notions de microfluidique et de labopuce, afin de comprendre leur apport à notre problème. Puis une revue des principales techniques existant pour le micro-fractionnement sanguin est proposée, tout en considérant les problématiques spécifiques aux échelles microscopiques. Le Chapitre 4 aborde les aspects pratiques et expérimentaux qui sont spécifiques à l'utilisation de microsystèmes pour le sang. Il passe donc en revue tout d'abord le sang et ses différents modèles physiques, puis les procédés de microfabrication utilisés et enfin le banc expérimental mis en place. Par ailleurs, du fait du changement d'échelle, il a été nécessaire d'adapter les méthodes macroscopiques à notre cas, en particulier pour la caractérisation et la validation des dispositifs à venir. Enfin, le Chapitre 5 permet une première prise en main de ces aspects expérimentaux spécifiques, en proposant une évaluation de certains principes connus de microfluidique passive qui paraissaient intéressants au vu de l'étude bibliographique préliminaire conduite au Chapitre 3. Ce chapitre présente donc les avantages et les inconvénients de chacune de ces techniques existantes mais permet également de faire germer les techniques innovantes qui seront abordées par la suite dans les Chapitres 6, 7 et 8.*

III. Etat de l'art

Le besoin de miniaturiser la démarche du traitement de l'échantillon sanguin, de son prélèvement à son analyse, a été mis en évidence dans le Chapitre 2. Avant d'entrer dans le vif du sujet, il nous a paru tout d'abord nécessaire d'introduire les notions de microfluidique et de laboratoire sur puce, afin de comprendre ce que ces concepts peuvent apporter à notre problème. De même, les problématiques aux échelles microscopiques sont différentes de celles abordées précédemment en macrosystème. A cet effet, ce Chapitre 3 propose une revue des principales techniques existantes pour le micro-fractionnement sanguin et permet de nous positionner par rapport à l'état de l'art.

Dans ce but, une première section définira en quoi consiste la microfluidique. Puis une seconde section abordera brièvement la notion de laboratoire sur puce, avec en perspectives notre application bien ciblée des microsystèmes pour le sang, et une illustration par quelques exemples commercialisés. Enfin, une troisième section proposera une revue détaillée des principales techniques de fractionnement sanguin en macrosystème.

A. La microfluidique

A.1. Définition

La microfluidique peut être définie comme le génie des microprocédés. Elle comprend l'ensemble des disciplines et savoir-faire mobilisés pour développer, sur des systèmes de l'ordre du μm , soit des procédés de transformation soit, comme dans notre cas, des procédés d'analyse.

Les disciplines qui interviennent sont tout d'abord la mécanique des fluides (d'où le terme de microfluidique), la physique sous toutes ses facettes, la chimie et la biologie tandis que les savoir-faire et techniques qu'il convient de maîtriser sont ceux des microtechnologies. Ces deux points seront abordés successivement dans ce chapitre, avec tout d'abord quelques notions sur les écoulements à faibles dimensions, puis la présentation des principales techniques de la microfluidique.

A.2. Microfluidique et écoulements à faibles dimensions

Aux échelles microscopiques, les écoulements diffèrent de ceux étudiés par la mécanique des fluides aux échelles macroscopiques. En effet, des phénomènes comme la capillarité et les forces de viscosité deviennent prépondérants tandis que d'autres, comme la gravité, deviennent négligeables. Ces différents écoulements, quelles que soient leurs échelles, sont caractérisés et comparés à l'aide de nombres dits adimensionnels. L'ensemble des nombres adimensionnels utilisés dans le domaine de la

microfluidique ont été recensés avec les phénomènes qui leur sont associés par Squire et col. dans [SQU 05]. Les nombres adimensionnels les plus importants pour la compréhension de ce travail sont rapidement introduits ici :

✓ Le nombre de Reynolds (Re) définit la nature de l'écoulement. Il caractérise le rapport entre les forces d'inertie et les forces de viscosité (Equation III-1),

$$Re = \frac{UD_h}{\nu} \quad (\text{III-1})$$

où U est la vitesse de l'écoulement, D_h le diamètre hydraulique et ν la viscosité cinématique. Ce nombre varie de 10^{-8} à 10^{-4} dans la plupart des systèmes fluidiques mais peut atteindre des valeurs supérieures à l'unité. Cette gamme de valeurs assure un régime laminaire car le régime turbulent apparaît, par exemple dans une conduite rectiligne, autour de $Re=2000$. La Figure III.1.a illustre la différence entre un régime laminaire et un régime turbulent. Dans nos dispositifs, Re sera généralement compris entre 0,01 et 50.

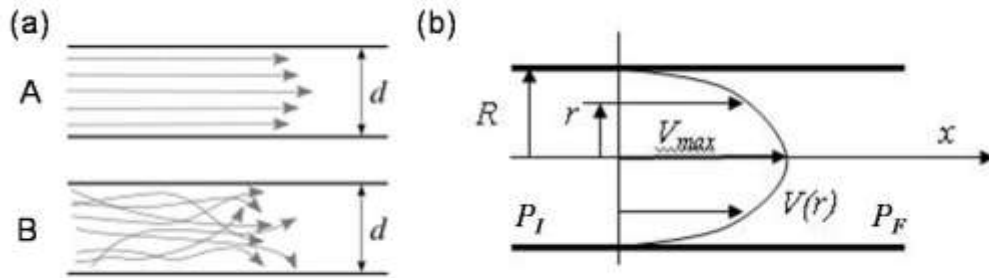


Figure III.1 : Spécificités d'un écoulement à bas nombre de Reynolds. (a) Comparaison d'un écoulement laminaire A et d'un écoulement turbulent B, d'après www.fr.wikipedia.org. (b) Profil parabolique d'un écoulement de Poiseuille, d'après www.epiphys.emn.fr.

A faible Re , l'écoulement d'un fluide circulant dans un canal soumis à une différence de pression ΔP présente un profil de vitesse parabolique, comme illustré dans la Figure III.1.b, avec une vitesse nulle aux parois et une vitesse maximale au centre du canal. Ces écoulements portent le nom de Poiseuille. Le débit Q du fluide dans un canal de section rectangulaire est alors directement relié à la différence de pression ΔP aux extrémités du canal par l'expression de l'Equation (III-2),

$$\Delta P = \frac{12\mu L}{\pi w H^3} Q \quad (\text{III-2})$$

où L est la longueur du canal, w sa largeur et H sa profondeur.

✓ Le nombre de Péclet (Pe) exprime le rapport entre la convection et la diffusion,

$$Pe = \frac{UD_h}{D} = \frac{UD_h}{\nu} \cdot \frac{\nu}{D} = Re \cdot S_C \quad (\text{III-3})$$

où D est la constante de diffusion du fluide et S_C le nombre de Schmidt. On observe que, pour un fluide donné, S_C est fixé et par conséquent Pe et Re sont proportionnels. Dans les systèmes microfluidiques la disparition des turbulences inhérente à la petitesse de Re , donc de façon équivalente à la petitesse de Pe , limite le mélange à la seule diffusion moléculaire. Les temps de mélange entre deux fluides mis en contact deviennent donc extrêmement longs, avec des temps $\tau \approx D_h^2/D$. Il est parfois nécessaire de réduire ce temps de mélange, lorsque par exemple les cinétiques de réaction sont rapides ou que les débits d'écoulement sont importants. Pour cela, certaines équipes

accélèrent le mélange, avec des écoulements chaotiques engendrés par des chevrons placés dans le fond du canal fluide [STR 02, SET 06], des lignes de piliers [MIR 09].

Il existe de nombreux autres nombres adimensionnels tels que le nombre de Dean, qui relie les forces inertielles et centrifuges aux forces visqueuses dans les coudes et sera présenté dans le Chapitre 5, le nombre capillaire, qui compare la viscosité à la capillarité... Ces nombres n'ayant pas été rencontrés dans les problèmes considérés ici, ils ne seront pas présentés.

A.3. Microfluidique et technologies associées

Comme expliqué précédemment, la microfluidique rassemble différentes technologies. De façon générale, elle comporte trois grandes composantes dont l'organisation est présentée de façon synthétique dans la Figure III.2.

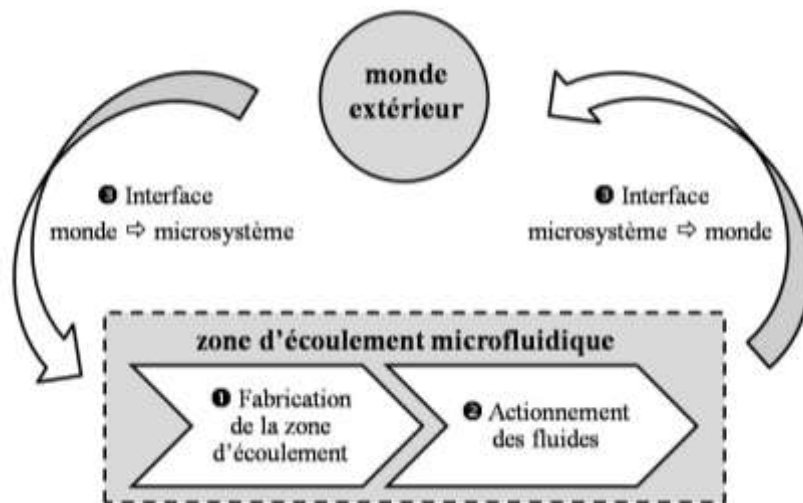


Figure III.2 : Schéma fonctionnel des technologies microfluidiques, qui peuvent être regroupées en trois grandes composantes.

✓ La première composante microfluidique concerne la **microfabrication des zones d'écoulements**, généralement des micro-canaux et les **traitements de surface associés**. Cet aspect a bénéficié de l'avancée des techniques de micro-électronique. On distingue entre autre les technologies « dures », fondées sur des matériaux durs comme le verre et le silicium, et les technologies « plastiques » ou « molles », fondées sur des matériaux tels que les polymères (PDMS) et les plastiques (PMMA, PC)*. Les technologies silicium et polymère, toutes les deux communément utilisées au laboratoire, seront abordées plus en détails dans le Chapitre 4.

Comme le rapport surface sur volume augmente dans ces micro-canaux, les phénomènes d'adsorption, surfaciques, deviennent non négligeables avec la miniaturisation des systèmes et doivent être considérés. C'est pourquoi une partie importante de la microfabrication concerne les traitements de surface, pour garantir la

* PDMS = Polydiméthylsiloxane, PMMA=Polyméthylméthacrylate, PC=Polycarbonate.

biocompatibilité d'un matériau ou éviter l'adsorption non spécifique, mais également pour greffer des sondes [PUG 07] comme expliqué dans le Chapitre 9.

✓ La seconde composante microfluidique comprend l'ensemble des techniques permettant **l'actionnement des fluides** dans la zone d'écoulement définie précédemment. Ce terme est très générique et regroupe différentes fonctions fluidiques, telles que l'injection du fluide et son déplacement, mais également des opérations fluidiques comme le mélange ou la séparation. Afin de permettre ces fonctions, différents outils microfluidiques sont disponibles comme par exemple les vannes, les pompes, les mélangeurs, les trieurs...

Il existe différents principes permettant de déplacer un fluide dans un microcanal, tels que l'électro-hydrodynamique, les effets électro-osmotiques ou la magnétohydrodynamique. Les méthodes les plus classiques consistent à contrôler l'écoulement en imposant le débit à l'entrée du canal ou une différence de pression. Ces deux dernières, qui impliquent toutes les deux un écoulement de Poiseuille, sont en théorie équivalentes. Cependant, en pratique, ce choix de contrôler l'injection par le débit ou la pression a des conséquences considérables du point de vue expérimental, ce qui sera discuté dans le Chapitre 4.

Par ailleurs, ce déplacement microfluidique peut se faire de deux façons : de manière continue ou de manière discontinue avec des gouttes [FOU 08]. Ici nous nous attacherons uniquement à la microfluidique dite continue.

✓ Enfin, la troisième et dernière composante microfluidique réunit les techniques qui assurent le couplage **entre le monde extérieur et la zone d'écoulement**, c'est-à-dire l'interface entre des systèmes d'échelles totalement différentes. En effet le dispositif est généralement complexe tout en occupant un volume réduit, tandis que son système de commande occupe un volume beaucoup plus important. Ce point est essentiel et rend difficile l'intégration globale d'un protocole biologique complexe, d'autant plus en microfluidique continue. C'est pourquoi cet aspect fera l'objet d'une description plus approfondie dans le Chapitre 11.

B. Les laboratoires sur puces et leurs applications au sang

B.1. Labopuces et généralités

Les laboratoires sur puces (labopuces ou LOC) se définissent comme des microsystèmes implantant une ou plusieurs étapes d'un protocole d'analyse biologique ou chimique. Ce domaine s'est largement développé depuis deux décennies, grâce en particulier aux progrès réalisés dans les différentes technologies de la microfluidique décrites précédemment. Les labopuces sont plus attrayantes que les macrosystèmes pour plusieurs raisons : en diminuant le volume de réactifs, ils rendent les analyses moins chères, plus rapides et éventuellement plus reproductibles. Les labopuces aident également à la compréhension de certains mécanismes biologiques, neurobiologiques, pharmacologiques... en permettant un contrôle précis et rapide, de l'environnement d'une cellule unique [KIM 08] par exemple. Les revues de Manz et col. [REY 02, AUR

02, VIL 04] sont des références dans le domaine des labopuces et en recensent les principales technologies et applications.

L'intérêt principal des labopuces est de permettre un test rapide et transportable, aux applications diverses. Une utilisation fréquente du LOC est faite par le médecin, en vue d'une prise de décision rapide, que ce soit en consultation, en médecine d'urgence ou en salle d'opération. Le LOC doit éventuellement être utilisable par le patient lui-même, chez lui, pour un suivi journalier par exemple. Dans l'ensemble de ces cas, on parle de systèmes de diagnostic au « point d'intervention » (ou « point of care »). Comme l'expliquent Chin et col. dans [CHI 07.2], une application prometteuse et demandeuse est le diagnostic dans les pays en voie de développement, où les composants miniaturisés doivent être portables, robustes, ne nécessitant ni équipement lourd ni personnel qualifié et surtout à bas prix.

Comme schématisé Figure III.3.a, les LOC doivent intégrer toutes les étapes d'un protocole biologique : l'extraction de l'échantillon et son injection dans la puce, son déplacement, sa préparation, l'analyse ciblée, puis la détection du résultat et la communication de celui-ci vers l'utilisateur final. Une description plus détaillée de la plupart de ces étapes est disponible dans le chapitre consacré aux labopuces de [PUG 07].

De nombreux laboratoires se sont concentrés sur l'étape de l'analyse et de la transduction du diagnostic (la traduction du signal biochimique en un signal électrique) à l'utilisateur, tout d'abord en augmentant la sensibilité des méthodes de détection et ensuite en pré-concentrant les cibles en dehors de la puce, par des méthodes macroscopiques conventionnelles. La préparation de l'échantillon est, quant à elle, une étape rarement intégrée et plus récemment considérée. Elle est complexe, principalement à cause de la composition multiple de la plupart des échantillons biologiques. Des revues s'intéressent tout particulièrement à ce problème [LIC 02, MAR 08, TON 05, DEM 03] en qualifiant cette étape de « maillon faible » des LOC.

L'intégrabilité d'un protocole biologique complet dans un LOC fait l'objet de la revue [HAE 07]. Son but est de présenter et comparer les différentes plateformes microfluidiques existantes pour les labopuces ainsi que leur cohérence en vue d'une intégration totale. On distingue principalement les plateformes suivantes :

- ✓ les bandelettes, avec le déplacement du liquide par capillarité, comme dans l'exemple classique du test de grossesse.
- ✓ les dispositifs en canaux avec déplacement du liquide par contrôle en pression ou débit, comme dans l'exemple de la Figure III.3.b, composé de différentes fonctions telles que les chambres, des pompes, des valves...
- ✓ les CD en rotation, avec déplacement du liquide par force centrifuge, comme dans les exemples développés par la suite.
- ✓ les plateformes électrocinétiques, comme dans l'exemple de la puce Agilent représentée Figure III.3.c, qui permet de réaliser des électrophorèses capillaires pour l'étude de l'ADN et des protéines, avec une détection optique en fluorescence.
- ✓ les plateformes d'électromouillage, comme dans l'exemple de la Figure III.3.d [SRI 04, FOU 06, FOU 07].

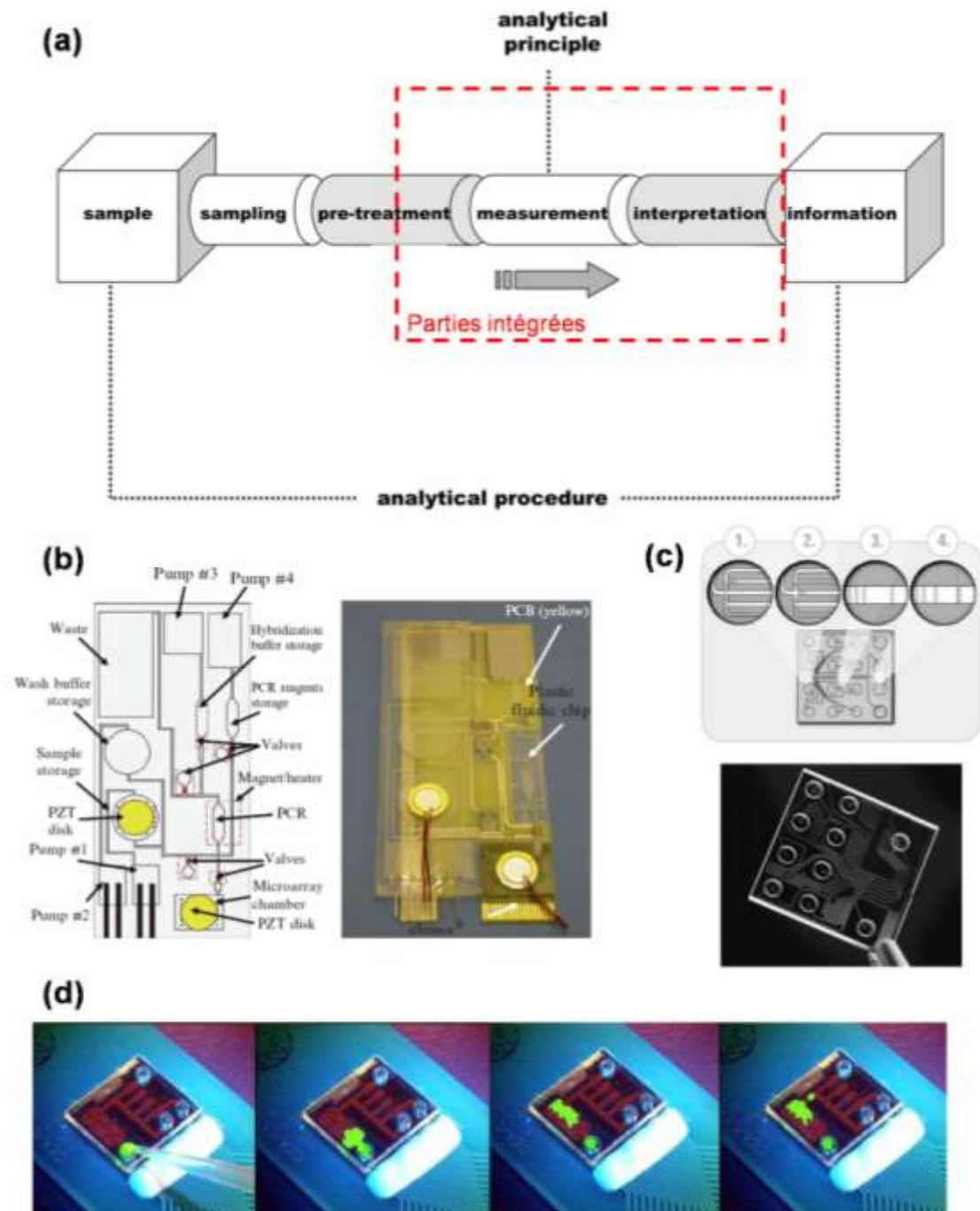


Figure III.3 : Généralités sur les labopuces. (a) Schéma d'un protocole analytique générique, d'après [DEM 03]. (b) Dispositif intégré en carte plastique, d'après [LIU 04]. (c) Plateforme électrocinétique Agilent pour un déplacement par électro-osmose et analyse par électrophorèse capillaire, d'après [HAE 07]. (d) Plateforme EWOD et observations en fluorescence, d'après [FOU 06].

B.2. Labopuces et échantillon sanguin

B.2.1. Etat de l'art

La complexité de l'échantillon sanguin a été illustrée dans le Chapitre 1 tandis que la démarche macroscopique nécessaire, du prélèvement aux analyses sanguines, a été discutée dans le Chapitre 2. Quelques exemples de labopuces pour le sang sont présentés dans la Figure III.4.

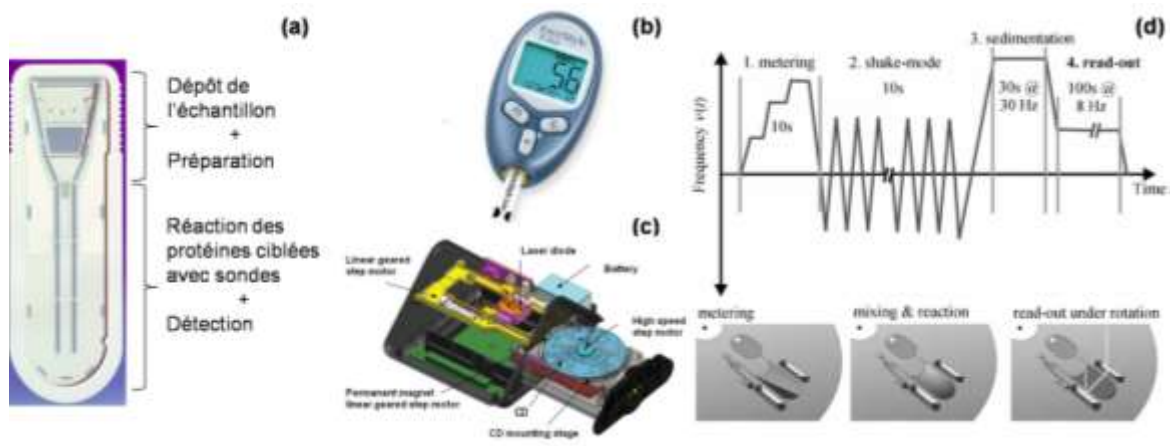


Figure III.4 : Labopuces et échantillons sanguins. (a) Puce Biosite permettant de confirmer en 15min la réalité d'une crise cardiaque, d'après www.biosite.com. (b) Système FreeStyle Lite de Abbott Point of Care Inc. permettant un dosage glycémique en 5sec, d'après www.abbottdiabetscare.co.uk. (c) Exemple de dispositif CD pour test immunologique [CHO 07.2]. (d) Protocole en fréquence pour un test alcoolémique sur échantillon sanguin en 150sec, d'après [STE 06].

L'essentiel des LOC appliqués au sang se sont jusqu'à présent davantage concentrés sur l'étape de l'analyse sanguine. Cependant, dans la plupart des cas considérés, la préparation de l'échantillon est réalisée en dehors de la puce, par des méthodes macroscopiques classiques comme la lyse sélective [EAS 06] ou la centrifugation.

Quelques microsystèmes permettant une analyse directement à partir d'une goutte de sang existent également et sont déjà commercialisés. Ces exemples sont possibles lorsque l'analyte ciblé est en très forte quantité dans la matrice sanguine et/ou que la méthode de détection est très sensible ; on comprend alors qu'aucune concentration/isolation supplémentaire de l'analyte ne soit nécessaire. On peut citer les exemples suivants : (i) la puce Biosite (Figure III.4.a) qui permet la détection de 3 protéines du myocarde présentes en excès lors d'une crise cardiaque, (ii) le dispositif FreeStyle Lite (Figure III.4.b) qui permet un dosage du glucose pour les personnes diabétiques, (iii) les systèmes Cholestek et Coaguchek, mais également (iv) le dispositif en PDMS proposé par Kim et col. [KIM 06] qui permet l'identification du groupe sanguin. Notons que ces dispositifs intégrés commerciaux correspondent souvent à des plateformes capillaires, dans lesquelles une goutte de sang est prélevée au bout du doigt, déposée sur une bandelette où elle migre et réagit avec une partie fonctionnalisée. Le résultat est ensuite analysé sur un petit système portable, optique ou électrique.

On peut également noter le développement de microsystèmes de prélèvement utilisant des réseaux d'aiguilles microfabriquées. Mais la technologie utilisée est complexe et ne semble pas encore permettre de couplage à une étape de préparation ou d'analyse.

L'intégration totale du cheminement sanguin est donc assez rare. Une exception concerne cependant les laboratoires sur CD, qu'ils soient de Gyros ou Imtek. Ce sont de beaux exemples de protocoles intégrés avec un traitement de l'échantillon sanguin couplé à une analyse ciblée. La revue de Steigert et col. [STE 05.2] présente les différentes fonctions fluidiques intégrées par Imtek comme le tri, le mélange et même la détection, pour l'intégration d'applications au sang très diverses telles qu'un dosage glycémique [GRU 06], un test d'alcoolémie [STE 06], des immunoessais [HON 05], de l'extraction d'ADN [CHO 07.2] ou des mesures du taux d'hématocrite [RIE 07]. Les avantages sont nombreux : le protocole est rapide, le procédé de fabrication est simple et compatible avec des cartes en plastique pour un moindre coût. Dans [FEL 03], M. Felton insiste sur l'importante parallélisation de ce principe et sa reproductibilité, car de multiples dispositifs sont placés sur un même CD et subissent exactement les mêmes conditions de centrifugation en même temps. L'unique limitation avancée est le contrôle du passage entre les différentes chambres par la seule vitesse de rotation, et l'utilisation de nombreuses vannes. Ce mode de contrôle de l'écoulement nécessite une bonne connectique, limite le nombre de liquides différents possiblement injectés dans une même puce, et nécessite d'établir des séquences de fréquences de rotation adaptées au protocole considéré, dont la Figure III.4.d présente un exemple. Par ailleurs, il est difficile d'interfacer ces plateformes avec des opérations électriques par exemple.

B.2.2. Démarches proposées

Les différentes opérations analytiques développées dans le laboratoire requièrent deux échelles de volume très différentes : soit un volume minimal inférieur à 100 μ L si le développement des méthodes de détection permet de gagner en sensibilité, soit un volume maximal de 2mL qui est celui nécessaire actuellement. Dans le premier cas, ce volume est obtenu par un prélèvement capillaire, tandis que dans le second cas, une prise de sang est nécessaire. Les principes de fractionnement mis en jeu pour ces deux volumes ne seront donc pas les mêmes et justifient que deux approches différentes aient été suivies :

✓ *La première approche*, sur petit volume (< à 100 μ L), vise à intégrer le prélèvement capillaire, le fractionnement et la stabilisation des analytes sur un même système. Les plateformes capillaires répondraient le mieux à ce cahier des charges. C'est pourquoi un dispositif en papier a été mis au point, représenté Figure III.5, permettant ces différentes étapes chez le patient puis l'envoi de l'analyte stabilisé dans un laboratoire d'analyse. Cette approche, à laquelle j'ai participé, ne sera pas développée ici [ROS 07, ROS 08].



Figure III.5 : Dispositif papier proposé et développé pour l'approche volume capillaire [ROS 08].

✓ *La seconde approche*, sur gros volume (2mL), a pour objectif de développer un système générique simple, miniaturisé et automatisé, capable de fractionner les principaux composants du sang, puis de l'interfacer avec des microsystèmes d'analyse, principalement sur le plasma (par exemple pour l'analyse par spectrométrie de masse des métabolites qu'il contient) et sur les GB (par exemple pour l'étude de leur transcriptome). Ici, une plateforme par microcanaux et contrôle de l'écoulement par microfluidique continue correspond le mieux au cahier des charges.

Cette thèse s'est concentrée sur cette seconde approche, en proposant le développement d'un microsystème de fractionnement sanguin, intégrable dans un processus complet d'analyse biologique.

B.2.3. Problématiques à considérer

La miniaturisation du fractionnement sanguin comporte de nombreux avantages spécifiques aux labopuces. La séparation devient possible sur des échantillons sanguins de petit volume (μL à 1-2mL) en un temps court (quelques sec à quelques min). Il est alors envisageable de ne prélever que la quantité de sang nécessaire et suffisante à l'analyse, qui plus est au moment opportun. Les systèmes sont davantage transportables, toutes les fonctions nécessaires étant intégrées dans une seule puce. Enfin les prix sont plus bas grâce à des technologies collectives de fabrication, bien qu'en pratique cet argument soit largement discutable selon la technologie choisie et le niveau d'intégration hybride (coût d'un dispositif papier différent de celui d'une puce en silicium).

L'utilisation de microsystèmes pour le fractionnement sanguin impose également des nouvelles problématiques biologiques qu'il faudra considérer par la suite :

✓ *Echantillon statistiquement significatif* : comme nous l'avons vu dans le Chapitre 2, la miniaturisation ne doit pas forcément impliquer une réduction du volume de l'échantillon, celui-ci devant rester statistiquement significatif par rapport à l'analyse ciblée. Il faut donc distinguer les principes de séparation pour volume capillaire ou pour volume analytique.

✓ *Le colmatage* : comme expliqué précédemment, la grande difficulté de l'intégration du sang en microsystème concerne sa grande proportion de cellules, qui représentent environ 50% du volume sanguin. Il en résulte un risque important de colmatage des dispositifs traversés, comme les microfiltres ou les canaux de petite dimension. La solution généralement choisie pour garantir une efficacité sur un plus long terme est la dilution de l'échantillon. L'inconvénient principal de la dilution est l'intégration éventuelle d'une étape de mélange diluant/échantillon, la nécessité d'une étape supplémentaire de re-concentration avant l'analyse des cibles, ainsi qu'une modification de la composition de l'échantillon.

✓ *L'adsorption non spécifique sur les surfaces rencontrées* : sur les surfaces PDMS ou silicium, le risque d'une adsorption non spécifique des cibles est élevé, aussi bien pour les protéines que pour les cellules. Ce problème est dû à l'état des surfaces mais également à l'importance du rapport surface/volume dans les microsystèmes. Ce problème est d'autant plus gênant que les analytes considérés sont rares et que le

volume de l'échantillon est faible. Le remède généralement proposé consiste en la saturation préliminaire de la surface (avec de la BSA [GRO 05]) ou en un traitement adapté de la surface afin de la rendre davantage hydrophile [WU 06] (PEG [KHA 04], silanisation, plasma O₂ [TOU 05]). Dans notre cas, ce point est moins critique que dans le cas du dispositif papier car le volume d'échantillon considéré est plus important.

✓ *La biocompatibilité des surfaces* : dans le même ordre d'idée, les surfaces rencontrées doivent être biocompatibles par rapport aux cellules. En effet, l'activation des PLT entraîne par exemple des changements de leur morphologie ainsi que leur agrégation tandis que l'activation des GB modifie leur transcriptome (dans une mesure difficilement quantifiable actuellement) [TON 05]. Ce point est essentiel, principalement au niveau du packaging (avec entre autre les capillaires et les colles utilisés) mais n'est pourtant que très rarement abordé dans la littérature.

✓ *L'activation par contrainte mécanique* : ce respect de l'intégrité cellulaire concerne également les aspects mécaniques car une contrainte importante (comme un cisaillement) peut également entraîner une activation cellulaire au même titre qu'une interaction avec une surface. La précaution principale ici est d'éviter la lyse des GR, que l'on appelle hémolyse. Les GR vont, une fois leur membrane ouverte, relarguer en solution l'hémoglobine qu'ils contiennent et qui est une protéine contaminante pour les analyses telles que la PCR ou les dosages protéiques.

✓ *La contamination d'un échantillon à l'autre* : le sang étant un échantillon porteur de multiples pathologies, il est indispensable d'éviter toute contamination croisée qui apporterait un biais évident aux analyses ultérieures. Il en résulte la nécessité d'un dispositif consommable : jetable et si possible à faible coût.

✓ *Les techniques de caractérisation* : de façon plus générale, ce changement d'échelle nécessite des techniques de caractérisation biologique différentes. Celles-ci doivent être adaptées au volume considéré. Ce point sera développé davantage dans le Chapitre 4.

C. La préparation d'échantillon sanguin en microsysteme

Cette section s'intéresse à l'état de l'art des techniques existant dans la littérature pour permettre le micro fractionnement sanguin. De nombreuses techniques de séparation en microsysteme ont été développées ces dernières années. A cet effet, on peut citer les revues de Toner et Irimia [TON 05], Pamme [PAM 07], Kersaudy et col. [KER 08] et plus récemment Tsutsui et Ho [TSU 09], qui recensent une grande partie de ces techniques. Elles s'appliquent aussi bien à des petits volumes d'échantillon (qqes μL) qu'à des volumes un peu plus importants (100 μL -1mL) selon le mode de séparation en continu ou non. Ces techniques sont réparties en deux catégories :

1/ Les techniques de fluidique passive : elles utilisent principalement la ségrégation par taille. Cette classe est dite passive car l'unique moteur de la séparation est l'écoulement du fluide. Cette classification regroupe entre autre la microfiltration, les réseaux de plots et la filtration hydrodynamique.

2/ Les techniques de fluidique active : elles combinent la fluidique avec l'utilisation d'une force physique qui tire profit des propriétés physiques intrinsèques et spécifiques des cellules telles que la densité, les caractéristiques diélectriques, le comportement magnétique. Dans ces techniques se trouvent ainsi la centrifugation, la diélectrophorèse, la magnétophorèse, l'acoustique et l'optique. On peut également y ajouter la lyse sélective et les molécules d'adhésion qui permettent une fixation des cellules, de façon plus ou moins spécifique, par une interaction transitoire ou non.

Une description de ces techniques est présentée dans la section suivante, avec l'illustration des principes abordés par quelques exemples tirés de la littérature. Cependant, étant donné le nombre croissant de publications sur le sujet, cette présentation ne peut se prétendre exhaustive.

C.1. Les techniques passives de séparation

C.1.1. La microfiltration.

Comme la filtration en macrosystème, le principe de la microfiltration est de faire passer les échantillons au travers de filtres dimensionnés à l'échelle du micron afin de trier les différents éléments selon leur taille. La littérature à propos de cette technique est abondante car c'est la principale méthode utilisée pour le fractionnement sanguin en microsystèmes. Nous pouvons distinguer globalement quatre types de filtres, schématisés dans la Figure III.6 : le filtre barrage, qui est constitué d'une fente perpendiculaire à l'écoulement et dont la hauteur définit le seuil de ségrégation, le filtre à piliers, dans lequel des piliers sont placés en ligne perpendiculaire au flux, le filtre transverse, qui est constitué de pores filtrants dont la particularité est d'être alignés parallèlement à l'écoulement, et le filtre membrane, qui permet une filtration 2D. Ji et col. ont comparé dans [JI 06] les paramètres critiques de ces différents filtres ainsi que leur efficacité. Ces résultats sont récapitulés dans le tableau de la Figure III.6.e. Le filtre transverse paraît dans cette comparaison expérimentale le filtre le plus intéressant, avec un volume analysable de sang plus élevé et un piégeage des GB plus efficace (de 70 à 95%), pour un débit de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$.

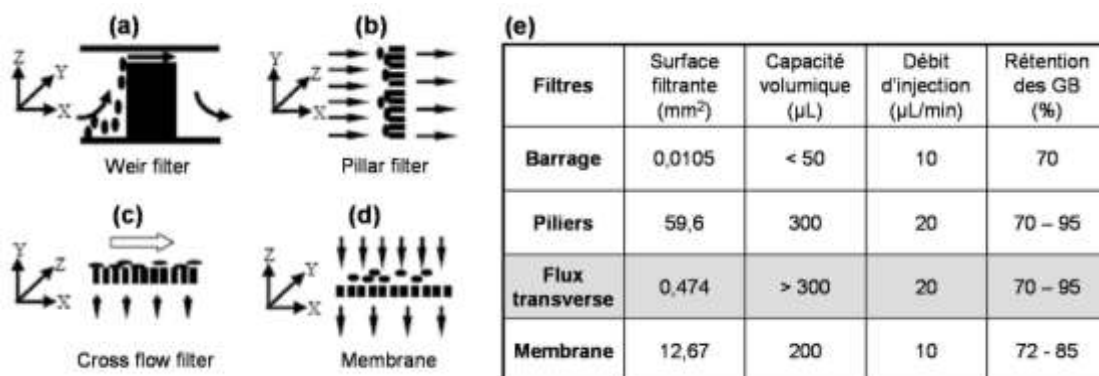


Figure III.6 : Représentation des différents types de filtres généralement utilisés dans la littérature et comparaison expérimentale, d'après [JI 06]. (a) Le filtre barrage. (b) Le filtre à piliers. (c) Le filtre à flux transverse. (d) Le filtre 2D ou membrane. (e) Etude comparée des quatre filtres schématisés précédemment.

La microfiltration est bien adaptée au tri GR/GB, avec par exemple une séparation de 60-95% de GR versus 70-95% de GB à 10 μ L/min dans [JI 06], ou encore 50% de GR versus 97% de GB à 5 μ L/min dans [SET 06.2]. Ce principe s'applique également pour l'extraction continue du plasma, avec 8% de plasma extrait lors d'une injection à 0,65 μ L/min.

Le gros inconvénient limitant de la microfiltration est le problème de colmatage des pores. Il a été mis en évidence dans [VAN 06], comme illustré dans la Figure III.7 : les GR et GB colmatent très vite les pores (ce colmatage est visible dès 1min d'injection) puis les GR, plus souples, tendent à se déformer sous la pression exercée afin de franchir les pores. Enfin les GR finissent par lyser sous la contrainte exercée.

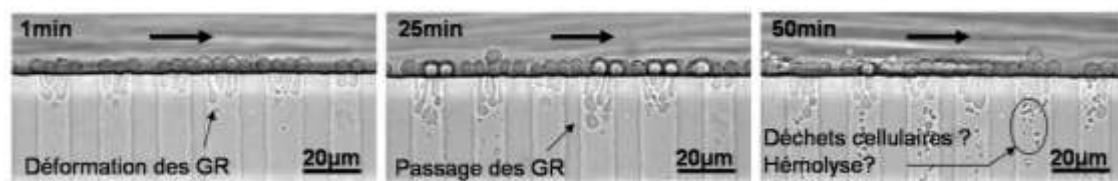


Figure III.7 : Difficultés de la microfiltration mises en évidence par VanDelinder et al. dans [VAN 06]. Ces photographies sont prises 1, 25 ou 50min après le début de l'injection. La flèche représentée dans les canaux sang représente le flux du sang, de gauche à droite.

La microfiltration est une technique simple à mettre en place et apparemment efficace. Les risques de colmatage et la probabilité de lyse des GR étant très élevés, cela explique que dans la plupart des publications, le système soit utilisé durant un laps de temps très court et avec la nécessité d'échantillons très dilués injectés à faibles débits (par exemple le sang est dilué à un facteur 1:200 et injecté à 10 μ L/min dans [JI 06]). Pourtant, malgré ces quelques difficultés, cette technique permet de réaliser un tri sanguin en flux et, du moins au début de l'injection, avec une très bonne pureté. C'est pourquoi ce principe sera étudié plus en détails dans le Chapitre 5.

C.1.2. La séparation par hydrodynamique

L'hydrodynamique permet de séparer les cellules selon leur taille mais sans utiliser de filtre au sens classique du terme. Deux types de séparation hydrodynamique ont été proposés par Seki et col. [SEK 07].

- Tout d'abord, le fractionnement par flux pincé (Pinched Flow Fractionation=PFF) schématisé Figure III.8.a aligne les particules le long de la paroi du canal pincé, à l'aide d'un second liquide injecté. Au moment de l'élargissement du canal, les particules se séparent les unes des autres selon leur taille. Le dispositif proposé dans [TAG 07] permet d'extraire 80% des GR à 20 μ L/h.

- Par ailleurs, la filtration hydrodynamique [YAM 05] exploite le comportement des particules au niveau d'un embranchement (Figure III.8.b). Soit une particule qui s'écoule dans le canal principal, elle arrive au niveau d'une intersection avec un canal perpendiculaire plus fin et n'entre dans celui-ci que si le débit relatif est plus fort au niveau de cette intersection. Ce processus permet d'éliminer progressivement la phase liquide tout en concentrant les cellules dans le canal principal. Un contrôle précis des débits de chaque canal permet un tri cellulaire.

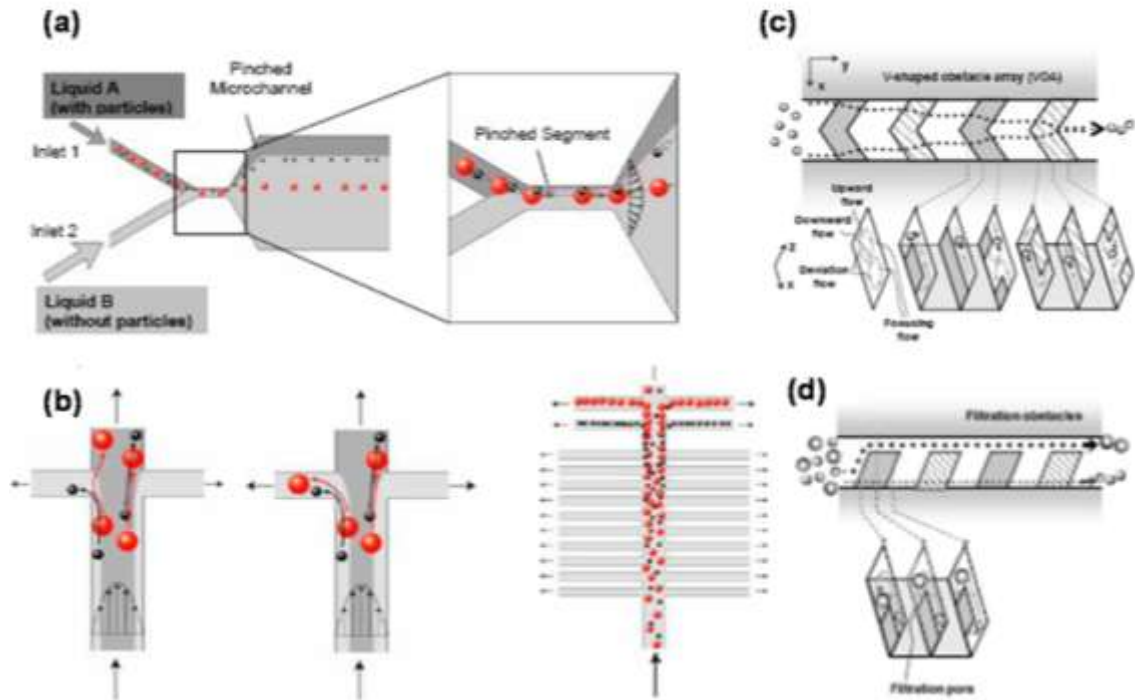


Figure III.8 : La séparation hydrodynamique. (a, b) Schématisation des principes de Fractionnement par flux pincé (PFF) et Filtration hydrodynamique, d'après [SEK 07]. (c) Principe de focalisation des particules par des obstacles en V, d'après [CHO 07.3]. (d) Filtration hydrophorétique proposée dans [CHO 07.4].

Ce dernier phénomène est similaire à l'effet Zweifach-Fung utilisé pour la fragmentation sanguine en microsystème. L'article de Yang et col. [YAN 06] est la référence la plus efficace dans le domaine. La pureté du plasma obtenu est voisine de 100 % avec des débits jusqu'à $4\mu\text{L}/\text{min}$. Le dispositif est simplement composé d'un canal principal et de ramifications, comme illustré dans la section consacrée au biomimétisme. Les dimensions ont été optimisées après modélisation afin de récupérer une fraction donnée du plasma, pour un rapport fixé des résistances fluidiques.

Des travaux plus récents de Choi et Park proposent des géométries originales pour une séparation en continu par hydrophorèse. Des obstacles dévient progressivement les cellules selon leur taille. Ce principe a été appliqué à l'extraction du plasma [CHO 07.3] ainsi qu'au tri GR/GB [CHO 07.4]. Les géométries proposées et les résultats obtenus dans ces deux cas sont présentés dans les Figure III.8.c et d. Dans le dispositif à plasma, le rendement est de 40% pour du sang de rat dilué au 1:4 injecté à $4\mu\text{L}/\text{min}$. Dans le dispositif à cellules, 85% des GB sont extraits pour du sang dilué au 1:20 injecté à $1\mu\text{L}/\text{min}$.

L'avantage majeur de toutes ces techniques purement hydrodynamiques est leur simplicité. Il suffit de contrôler l'écoulement du sang dans le canal, sans le besoin d'un champ physique extérieur supplémentaire. La fabrication des dispositifs en est simplifiée et donc également moins chère. Leur inconvénient majeur est que la taille est le seul critère de ségrégation, ce qui peut devenir limitant pour un tri cellulaire plus précis, ainsi que difficile à mettre en œuvre efficacement lorsque l'échantillon est complexe et trop concentré ; une dilution importante est donc indispensable.

C.1.3. Les plots et le déplacement latéral déterministe DLD.

Cette technique, appelée généralement DLD comme Déplacement Latéral Déterministe, utilise des réseaux contrôlés de piliers afin de séparer des particules ou cellules selon leur taille. Cette technique permet une séparation précise et efficace à l'échelle micrométrique, uniquement par les dimensions des particules.

Le principe est illustré dans la Figure III.9.a [DAV 06]. Les microstructures (ou piliers) agissent avec un effet de seuil (cut-off) ; les particules plus grandes qu'une taille critique ($d > R_{crit}$) sont envoyées vers une direction et les plus petites ($d < R_{crit}$) vers une autre. Une petite particule ($d < R_{crit}$) va zigzaguer entre les plots et suivre les lignes de courant. Les plus grosses particules, elles, sont plus larges que les lignes de courant formées entre les plots et ne peuvent pas les éviter ; elles se cognent de plot en plot dont la disposition en quinconce fait que, dans ce cas, elles sont déviées vers la droite. La taille critique de séparation R_{crit} est définie par l'équation (III.4) [LAR 06] comme :

$$R_{crit} = \alpha \frac{d}{N} \quad (\text{III-4})$$

où d est la distance entre plots, N le nombre de rangées dans chaque période de l'espace et α le terme correctif typiquement égal à 2,5 dans le cas de flux parabolique. Cette dimension critique peut être modifiée par ces 3 paramètres, mais α est limité par la fluidique et d par les techniques de nanofabrication. Seul N peut être augmenté plus facilement.

Cette thématique était relativement nouvelle, voire exotique pour la fragmentation sanguine au début de ma thèse. Le dispositif proposé par Davis et col. dans [DAV 06] fractionne les GR et les GB par différents réseaux de plots placés en série (Figure III.9.b). Ce système est efficace : 100% des GB sont récupérés dans les canaux 2 et 3 et 99% des GR dans le canal 1 (Figure III.9.c), mais a l'inconvénient majeur d'être très lent : 1 μ L de sang analysé en 1h.

Depuis, cette thématique s'est beaucoup développée ; on distingue plusieurs grandes tendances :

- ✓ La première tendance est de réduire la taille critique de séparation afin, entre autre, de passer en dessous de 100nm [ING 06, MOR 06]. Pour cela, Larsen et col. optimisent les techniques de lithographie nanoimprint [LAR 06] tandis que Beech et col. [BEE 08] appliquent une contrainte contrôlée sur un système DLD en PDMS afin de faire varier la distance entre piliers. Cette technique, dont le principe est illustré Figure III.9.d, permet de régler R_{crit} dans la limite de l'élasticité du système et de l'ajuster à l'échantillon considéré.

- ✓ La seconde tendance concerne les modèles fluidiques, qui deviennent plus complexes et prennent en compte la diffusion des particules [LON 08, HEL 08].

- ✓ Mais la tendance principale est de coupler le DLD avec d'autres principes de séparation afin d'en amplifier la sélectivité. Par exemple, Li et col. [LI 07] injectent avec l'échantillon sanguin des billes fonctionnalisées pour cibler les lymphocytes CD4+ et amplifier leur taille pour mieux les séparer. Huang et col. [HUA 08] couple le DLD à une séparation par magnétophorétique en modifiant les GR (ce principe sera expliqué par la suite). Enfin, l'idée originale proposée par Morton et col. dans [MOR 08] consiste à utiliser le DLD comme un outil permettant de faire migrer les cellules cibles et de les faire circuler successivement au travers de différents flux, le premier contenant par

exemple le réactif, puis le second le rinçage. Cette méthode, illustrée Figure III.9.e, a été appliquée au marquage et rinçage de PLT, ainsi qu'à la lyse de cellules.

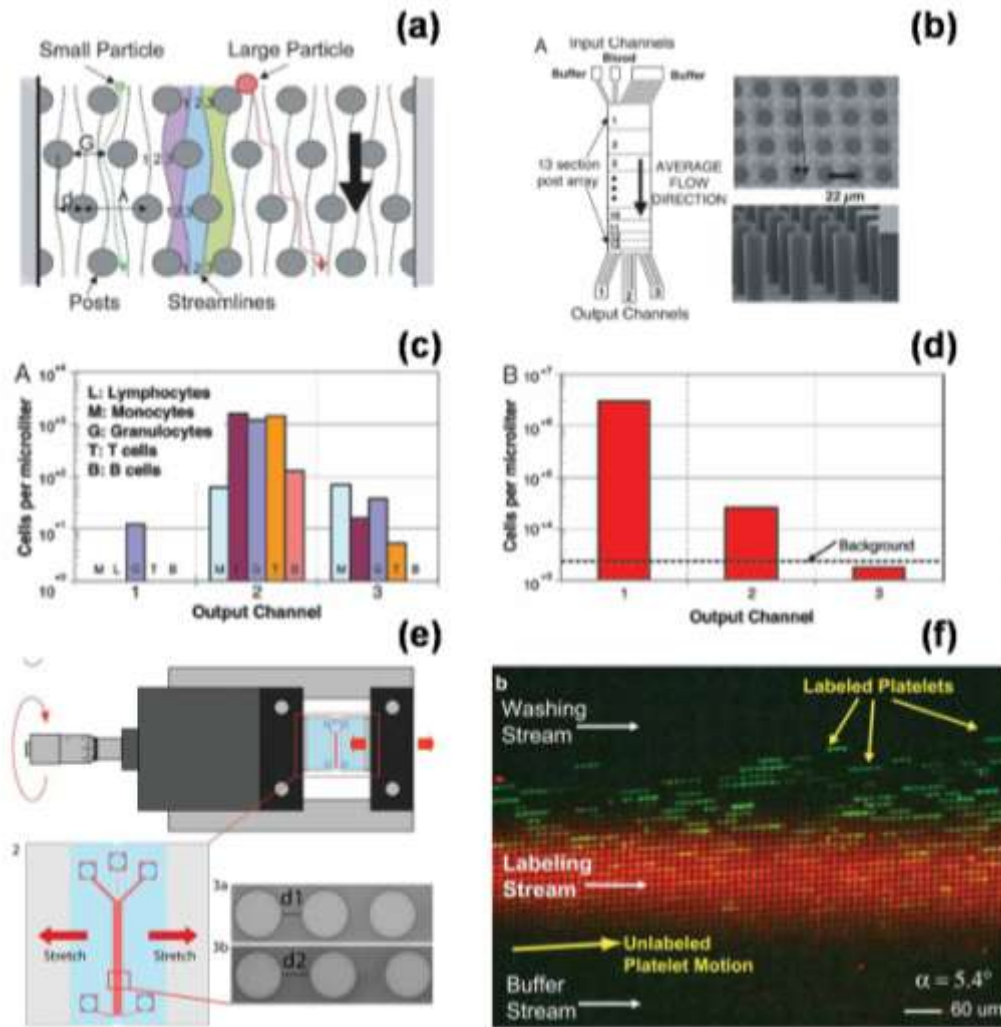


Figure III.9 : Le déplacement latéral déterministe DLD. (a) Illustration schématique du principe de séparation, d'après [DAV 06]. (b, c, d) Dispositif proposé par Davis et col. [DAV 06] et résultats obtenus pour la séparation GR/GB, avec une extraction des GB dans les canaux 2 et 3 (c), et une extraction des GR dans le canal 1 (d). (e) Un système original proposé par Beech et col. dans [BEE 08] permettant la déformation du réseau de piliers en PDMS et l'évolution de l'intervalle entre plots. (f) Marquage des PLT et rinçage dans un dispositif DLD, les piliers permettant aux PLT de traverser trois flux laminaires [MOR 08].

Ainsi cette technique, bien que nouvelle il y a trois ans, s'est largement développée depuis. Ce principe permet de séparer PLT, GR et GB en flux continu et avec une remarquable efficacité (plus de 90%) mais il nécessite cependant un débit lent ($< \mu\text{L}/\text{min}$) et une dilution importante. D'autres inconvénients de cette technique sont l'importance des conditions aux limites lors de la fabrication du dispositif, qui peuvent diminuer l'efficacité du système voire empêcher la séparation souhaitée [ING 09], ainsi que le dimensionnement des piliers, qui doit être précis avec une technologie de fabrication adaptée et relativement complexe.

C.1.4. La micro-centrifugation.

Etant donné l'omniprésence de la centrifugation dans les techniques macroscopiques de séparation sanguine, la miniaturisation de ce phénomène est une option évidente. Parmi les différents microsystèmes fondés sur la centrifugation, on distingue ceux concernant l'adaptation de la centrifugation standard sur un CD en rotation et ceux utilisant un canal fixe en forme de spirale. A ce jour, seuls les dispositifs sur CD donnent des résultats probants car, comme nous l'évoquerons ultérieurement dans le Chapitre 5, les écoulements en microcanaux coudés sont plus complexes qu'il n'y paraît et des forces autres que la seule force centrifuge interviennent.

Le dispositif proposé par Haeberle et col. dans [HAE 06] consiste en un dispositif d'extraction du plasma où la sédimentation est forcée par centrifugation sur un CD en rotation. Le principe est décrit dans la Figure III.10 : le sang est directement pipeté dans le réservoir d'entrée puis le CD est mis en rotation à petite vitesse. Une valve hydrophobe assure le remplissage du réservoir ainsi que la vidange du trop plein pour un aliquotage parfait. Le CD tourne ensuite à pleine vitesse (de 30 à 50 Hz, soit une accélération centripète de 100 à 300g) afin d'ouvrir la valve et de lancer la séparation ; le sang circule le long d'un drain où il est fractionné avant de s'écouler dans une chambre de décantation dont le plasma surnageant est récupéré. Cette technique permet d'extraire 2 μ L de plasma pur (une contamination en GR de 0,11% et pas d'hémolyse) à partir de 5 μ L de sang, en seulement 20sec. De plus, plusieurs dispositifs de cette sorte sont placés sur un seul CD pour une parallélisation des préparations d'échantillons.

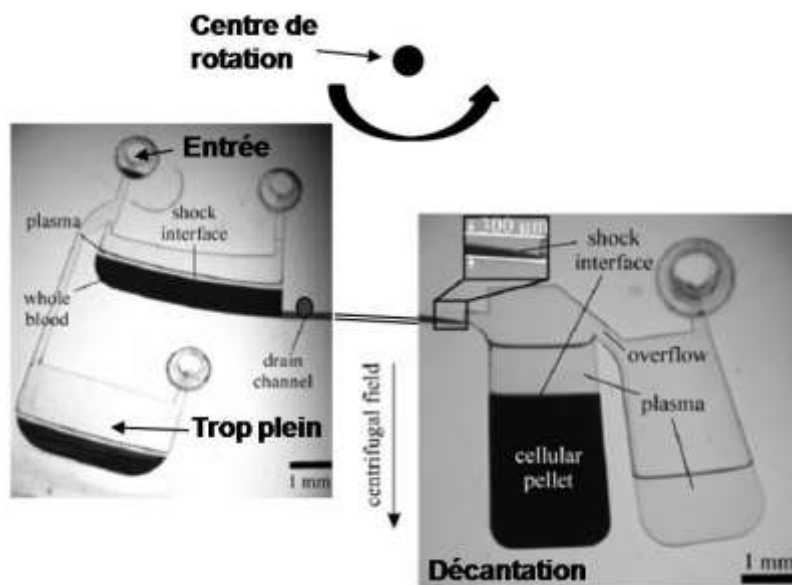


Figure III.10 : Description du laboratoire-sur-CD pour l'extraction du plasma [HAE 06]. 1/ Phase de calibration du volume sanguin grâce à la valve hydrophobe : vidange du trop-plein dans un second réservoir. 2/ Phase d'accélération : le CD tourne à pleine vitesse pour rompre la valve et débiter la centrifugation. 3/ Passage par le drain. 4/ Phase de décantation : seul le trop plein de la chambre (c'est-à-dire le plasma) est récupéré.

Ce dispositif permet d'obtenir des aliquotes calibrées de plasma (2 μ L), simplement (par la seule force centrifuge), rapidement (en 20sec) et efficacement (ni contamination ni hémolyse) à partir de sang non dilué. Ce système présente donc peu de défauts, mis à

part que le volume extrait est relativement faible donc non adapté dans notre cas ; ce point est cependant discutable puisqu'une mise en parallèle d'une multitude de dispositifs sur un même CD augmenterait très fortement ce volume de plasma.

C.2. Les techniques actives de séparation

Comme expliqué ci-dessus, les cellules sanguines diffèrent par leur taille et leur volume. Mais elles se différencient également par d'autres propriétés physiques intrinsèques qui leur sont spécifiques et permettent d'envisager des modes de fractionnement autres que les centrifugation et filtration traditionnelles. On peut citer par exemple la permittivité électrique, les caractéristiques diélectriques ou le comportement magnétique.

C.2.1. La diélectrophorèse.

La diélectrophorèse utilise le comportement diélectrique des cellules, fonction de leur composition, leur morphologie et leur organisation structurale, dans un champ électrique non uniforme. Son application à la séparation cellulaire est intéressante car elle permet de manipuler les cellules sans traitement préliminaire. Par ailleurs, un changement dans la composition protéique de la membrane cellulaire (par exemple lorsque les cellules sont cancéreuses) génère une modification de ces propriétés diélectriques détectable par les systèmes proposés.

La force associée peut être répulsive (DEP n) ou attractive (DEP p), selon la polarisabilité relative de la particule dans le milieu. L'amplitude et le signe de la force dépendent des propriétés électriques de la cellule et de celles du milieu, de la fréquence du courant appliqué et du gradient de champ.

La première stratégie d'utilisation de la DEP utilise la dépendance en fréquence. A basses fréquences, les cellules lévitent (force DEP n). A plus hautes fréquences (supérieures à une fréquence critique), les cellules « tombent » et adhèrent aux électrodes. Cette fréquence critique étant variable pour chaque catégorie de cellules sanguines, Gascoygne et col. isolent chacune de ces cellules dans des zones différentes de leur dispositif, chaque zone étant caractérisée par une fréquence donnée [DAS 05]. Ce principe est schématisé dans la Figure III.11.a. Cette accroche positive est spécifique, mais ses inconvénients majeurs sont l'adhésion non spécifique des cellules sur les électrodes lors du mode DEP p ainsi que son mode de fonctionnement discontinu (puisque'il faut repasser en mode DEP n pour récupérer successivement les différents types cellulaires accrochés).

La seconde stratégie de la DEP utilise une fréquence donnée. Les cellules, injectées lentement dans un flux laminaire, sont alors progressivement déviées de leur trajectoire par la force DEP n créée par un réseau d'électrodes inter digitées. L'amplitude de cette déviation est fonction des propriétés électriques des différents types cellulaires considérés. Il en résulte une séparation en flux continu. Ce principe, initialement proposé par Choi et Park dans [CHO 05], fut tout d'abord appliqué à des particules en polystyrène à l'aide d'électrodes trapézoïdales représentées Figure III.11.b. Sur ce principe, on peut citer les récents travaux de Han et Frazier [HAN 08] illustrés Figure

III.11.c et d, qui séparent GR et GB en continu (87% de GR et 92% de GB), à partir d'un sang dilué au 1:5 et injecté à 50µL/h.

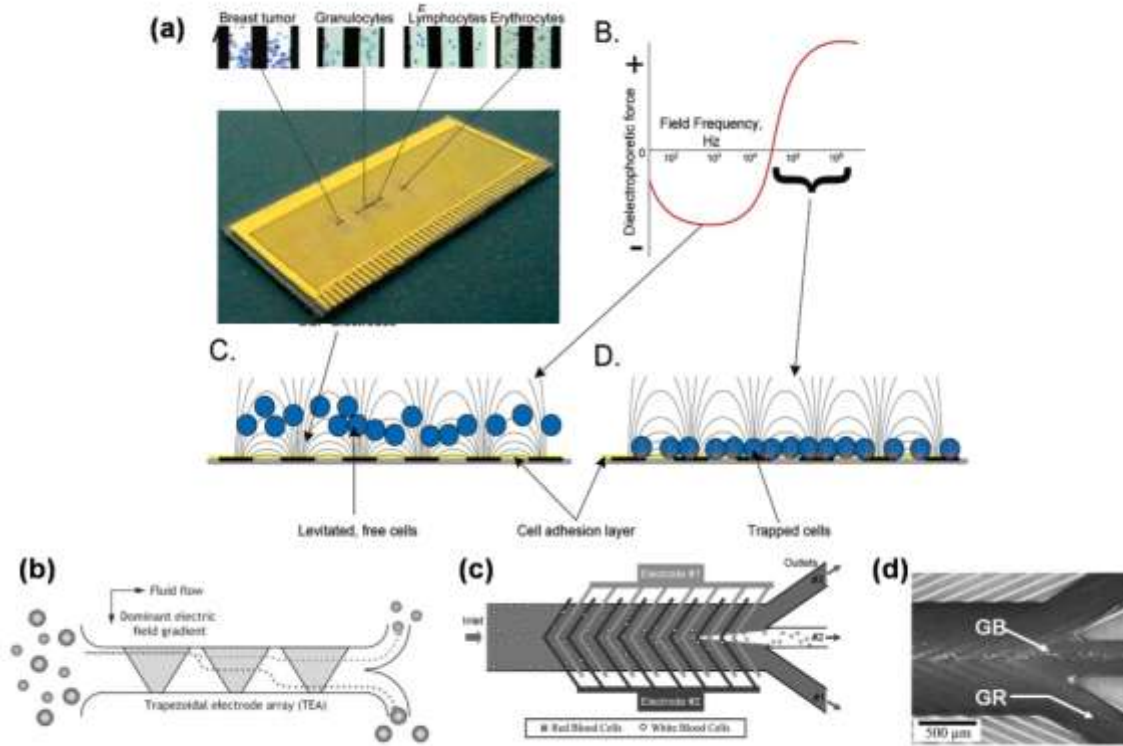


Figure III.11 : La diélectrophorèse. (a) Principe de la stratégie fréquentielle proposée dans [DAS 05] et résultats obtenus pour le tri des cellules sanguines. (b) Réseau d'électrodes trapézoïdales proposées par Choi et col. dans [CHO 05] pour une séparation diélectrophorétique continue. (c) Microséparateur magnétique divergent proposé dans [HAN 08] et (d) photographie en fluorescence d'une injection à 50µL/h, pour une tension sinusoïdale de 3Vp-p et 2MHz.

A notre connaissance, la seule publication traitant de l'extraction du plasma est celle de Nakashima et col. [NAK 07] qui étudie l'efficacité de l'extraction en fonction de l'amplitude et de la fréquence du courant alternatif utilisé, pour une goutte de 10µL de sang dilué au 1:10 et injectée par capillarité. Aucun résultat n'est donné.

C.2.2. La magnétophorèse.

La magnétophorèse utilise les propriétés magnétiques intrinsèques des cellules. Celles-ci sont généralement diamagnétiques ou paramagnétiques. Ces deux catégories se caractérisent par des effets magnétiques extrêmement faibles mais qui peuvent être observés lors d'une réduction d'échelle importante [PAM 06].

La force magnétique (F_m) appliquée sur une cellule s'exprime avec l'équation (III.5),

$$F_m = \frac{\chi \cdot V}{\mu_0} \cdot B \cdot \frac{\partial B}{\partial z} \quad (\text{III-5})$$

où χ est la différence entre la susceptibilité magnétique de la cellule et celle de son milieu, μ_0 la perméabilité du vide, V le volume de la cellule, B le champ magnétique extérieur et $\partial B / \partial z$ le gradient de champ magnétique.

Dans le cas du sang, GB, GR et plasma sont diamagnétiques. Les GR à l'état normal sont également diamagnétiques malgré le fer présent dans l'hémoglobine. En revanche, ils deviennent paramagnétiques une fois désoxygénés. Il paraît donc envisageable de fractionner le sang en le plongeant dans un champ magnétique, dans lequel les GB seraient repoussés par l'aimant tandis que les GR seraient attirés (Figure III.12.a).

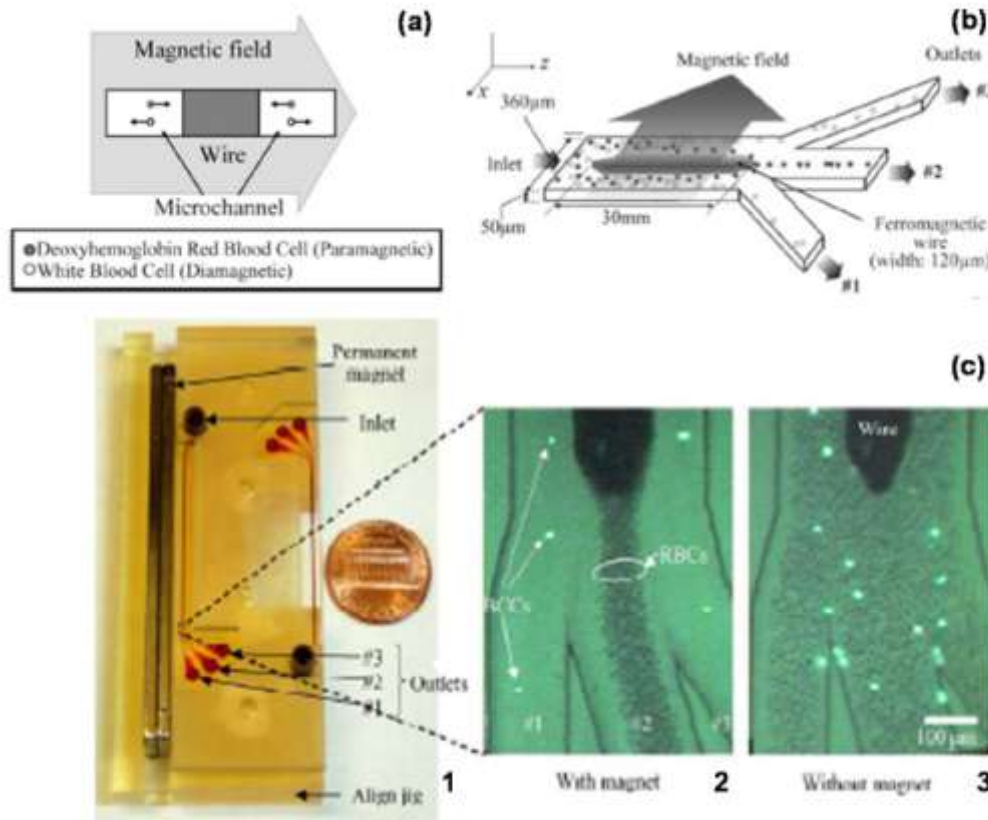


Figure III.12 : La magnétophorèse. (a) Comportement magnétique des cellules sanguines [HAN 06.1]. (b) Principe de la magnétophorèse intégrée dans un microsysteme fluide et séparation des cellules sanguines autour d'un fil de FeNi [HAN 06.2]. (c) Dispositif et résultats de Han et Frazier [HAN 06.2]. 1 : Vue d'ensemble du dispositif avec l'aimant, 1 canal d'entrée et 3 canaux de sortie. 2 : Observation pendant la séparation des cellules. 3 : Observation sans séparation.

Le principe utilisé par Han et Frazier [HAN 04, HAN 06.1 et HAN 06.2] ou Inglis et col. [ING 04] est celui des systèmes HGMF (High Gradient Magnetic Field). Un champ magnétique est produit par un aimant permanent. Cet aimant polarise un fil de FeNi pulvérisé sur un substrat verre, fil qui crée ensuite des gradients de champ magnétique au niveau du canal fluide. Comme représenté dans la Figure III.12.b, le sang circule autour du fil en FeNi, dans un canal longeant l'aimant. Les GR désoxygénés, paramagnétiques, sont attirés vers le centre du canal et extraits dans la sortie centrale tandis que les GB, diamagnétiques, sont repoussés vers l'extérieur et extraits dans les sorties externes (Figure III.12.c). Le sang est dilué au 1:10 dans un tampon isotonique d'hydro sulfite de sodium afin de désoxygéner les GR. Le rendement de capture est de 94 % pour les GR et de 97% pour les GB pour un débit de 0,5 μ L/h.

Le principe de la magnétophorèse est efficace et permet une séparation GR/GB en flux continu, mais il nécessite de désoxygéner les GR et de diluer le sang. Par ailleurs, les débits sont très faibles, de l'ordre du μ L/h, et l'ajout d'une partie ferromagnétique est une contrainte à considérer lors de la fabrication.

C.2.3. Acoustique et Ultrasons.

Cette technique, encore exotique il y a quelques années, se développe de plus en plus pour l'alignement de particules ou de billes fonctionnalisées à partir d'une suspension [NIL 04, HAW 04, WIK 06.1, WIK 06.2, AUG 07] et en particulier pour les cellules sanguines [PET 05, PET 06].

Le principe est le suivant : lorsqu'une suspension cellulaire est injectée dans une cavité exposée à une onde acoustique, les cellules sont soumises à une force de radiation acoustique. Cette force résultante (F_r) dépend de la densité (ρ) et de la compressibilité (β), du milieu (ρ_w, β_w) et des particules en suspension (ρ_c, β_c) [PET 06],

$$F_r = - \left(\frac{\pi P_o V_c \beta_w}{2\lambda} \right) \phi(\beta, \rho) \cdot \sin(2kx) ; \phi = \frac{5\rho_c - 2\rho_w}{2\rho_c + \rho_w} - \frac{\beta_c}{\beta_w} \quad (\text{III-6})$$

avec également V_c le volume de la particule, λ la longueur d'onde ultrasonique, P_o la pression et x la distance au nœud de pression. Cette force entraîne les cellules dans des nœuds de pression créés par ces ondes (Figure III.13.a), la conséquence étant l'alignement progressif des cellules dans ces nœuds. Ces ondes acoustiques sont produites par un transducteur de piézocéramique, comme illustré Figure III.13.b.

L'application la plus courante de l'acoustique est la séparation particules / milieu de suspension, comme dans le dispositif d'extraction du plasma proposé par Nilsson et col. dans [NIL 06] et représenté Figure III.13.c : du sang non dilué est injecté à 600 μ L/min dans un séparateur à huit branches. L'excitation est transversale, à l'aide d'une unique piézocéramique, de telle sorte que les cellules s'alignent au centre du flux. La division du canal en trois sorties permet alors de récupérer les cellules au centre et le plasma dans les deux sorties extérieures. Quatre dispositifs sont ainsi placés en série pour une contamination finale en GR inférieure à 1%. La qualité protéique du plasma extrait a été récemment confirmée dans [LEN 09].

L'application tri cellulaire a été abordée plus récemment ; c'est l'acoustophorèse (FFA=Free Flow Acoustophoresis). Elle nécessite l'ajout d'un milieu de contraste qui va modifier la densité du fluide et provoquer un gradient de particules. Ce principe a été appliqué avec succès à la séparation GR/PLT [PET 06] : 96% de GR au centre, 92% de PLT sur les bords.

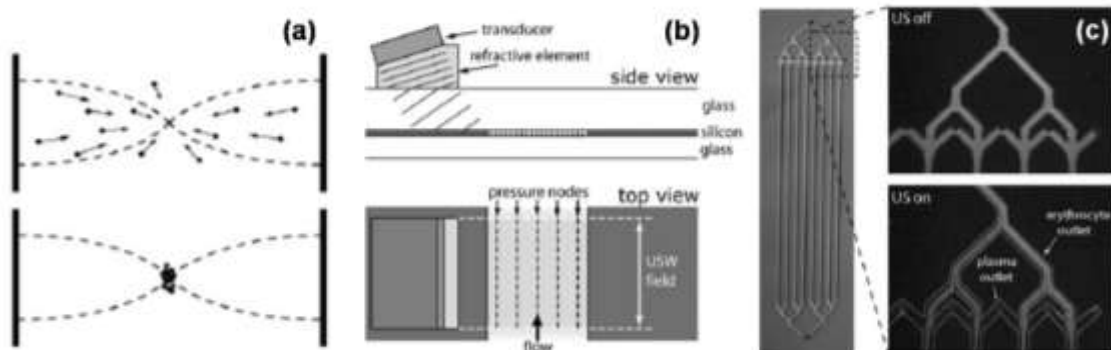


Figure III.13 : Micro-fractionnement sanguin par acoustique. (a) Application d'une force acoustique sur une suspension cellulaire et alignement des cellules dans un nœud de pression [NIL 06]. (b) Exemple de système microfluidique avec transducteur piézoélectrique [WIK 06.1]. (c) Séparateur à huit canaux proposé par Nilsson et col. pour l'extraction continue du plasma [NIL 06].

La séparation par ondes acoustiques a le grand avantage de se faire en continu, rapidement et sans limite d'efficacité dans le temps (aucun risque notable de colmatage). L'extraction du plasma se fait avec un excellent rendement et sans ajout/dilution de tampon supplémentaire. En ce sens, cette technique s'avère très prometteuse. L'utilisation des ondes acoustiques pour le tri cellulaire nécessite quant à elle une solution de contraste et donc une dilution.

C.2.4. L'optique.

La détection de types cellulaires par système optique est la technique conventionnelle utilisée pour l'analyse d'un échantillon sanguin par cytométrie en flux (appelée généralement FACS, Fluorescent Activated Cell Sorting). C'est pourquoi, malgré sa complexité et sa taille macroscopique, il est nécessaire d'aborder la manipulation optique ici.

Le principe général est le suivant [DHO 08] : une particule est analysée par un dispositif optique, soit par le signal de fluorescence qu'elle émet ou non après un marquage spécifique, soit par ses propriétés optiques intrinsèques (indice de réfraction, taille et forme). Suivant le résultat la particule est déviée ou non, par une force optique [ASH 87, WAN 05, MAC03], par une force électrique [YAO 04], ou par un changement de la configuration du canal microfluidique [FU 02].

L'utilisation d'une force optique pour la déflexion est une technique complexe qui fait l'objet d'études poussées depuis déjà quelques années, avec les premières manipulations optiques de cellules vivantes par Ashkin et col. [ASH 87]. Les rayons d'un faisceau induisent des forces sur la particule et en modifient la quantité de mouvement (Figure III.14.a). Ces forces optiques peuvent, selon la configuration du système, pousser, attirer ou faire léviter une particule en milieu fluide, avec une amplitude fonction de la puissance du système optique utilisé et des propriétés optiques relatives de la particule et du milieu qui l'entoure. On utilise le plus fréquemment la force optique comme commutateur (ou « optical force switching ») [WAN 05]. Dans la Figure III.14.b, les cellules sont alignées une par une au centre du canal par un flux de tampon puis analysées et déviées ou non selon le signal fluorescent émis.

Dans la littérature le principe est toujours le même, seules les géométries des systèmes varient ainsi que la technique utilisée pour concevoir le piège optique : des faisceaux laser multiples, des réseaux de fibres optiques... Par exemple, Mac Donald et col. [MAC 03] utilisent une chambre de fractionnement à pièges multiples dans un treillis optique 3D, de configuration modulable, et créé en interférant 5 faisceaux laser (Figure III.14.c). Lorsque les particules passent à travers la chambre de fractionnement, leur trajectoire dépend de la force optique exercée par le système d'interférence et de la force de frottement exercée par le flux. Ce système a été appliqué au tri GR/GB dans un échantillon riche en GB, pour une séparation à 95%.

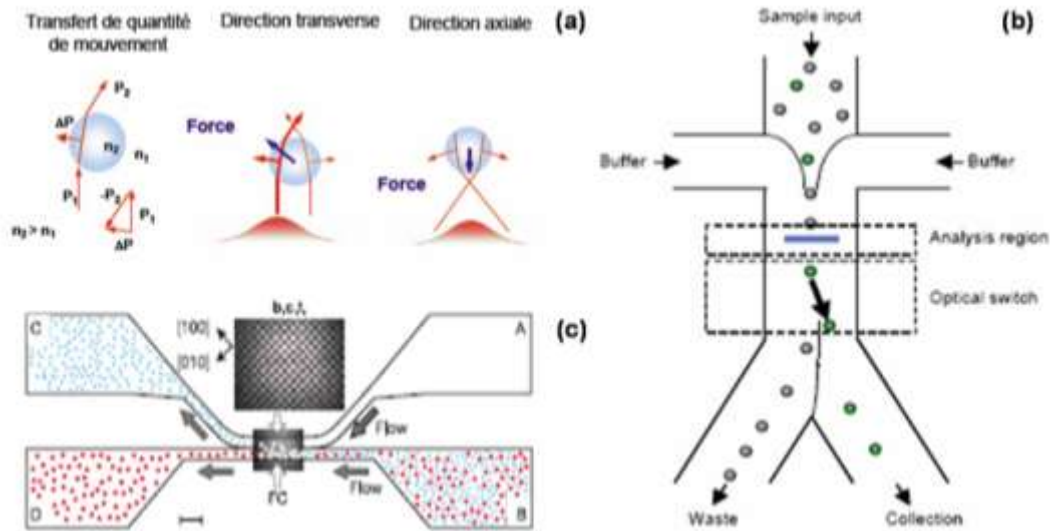


Figure III.14 : Tri cellulaire par méthode optique. (a) Principe de la déviation optique, d'après www.sti.epfl.ch. (b) Dispositif proposé par Wang et col. dans [WAN 05]. 5 à 25µL d'échantillon pour 1 mL de tampon, 90% des cibles détectées, 1000 à 280.000 cellules/heure avec un débit de 25mm/sec. (c) Fractionnement optique par interférences et chambre de séparation [MAC 03].

Ces approches optiques sont attrayantes. Elles permettent un tri cellulaire sensible et sélectif sans exercer de contact physique direct sur la cellule ; celle-ci ne subit donc pas de contraintes, comme le montre l'étude de [WAN 05] sur les protéines indicatrices de stress. La séparation se fait en flux, sans colmatage et il est même possible de travailler sur du sang complet [MAC 03]. Cependant, les systèmes optiques utilisés sont complexes, coûteux et l'instrumentation lourde utilisée n'est pas transportable. En conclusion la manipulation optique fait l'objet de travaux complexes et intéressants mais s'avère surtout adaptée pour la manipulation de cellules uniques.

C.2.5. Les molécules d'adhésion

Les molécules d'adhésion sont des molécules spécifiques permettant de fixer une cellule donnée sur un support solide (Figure III.15). Ces molécules peuvent être immobilisées sur un support fixe (sur les parois d'un canal ou sur des microplots placés à l'intérieur du canal) ou sur un support mobile (généralement des billes magnétiques).

Pour les GR, les principales molécules utilisées sont les lectines, qui attirent les GR en interagissant spécifiquement avec les monosaccharides de certains glycolipides présents sur les membranes des GR. Le problème est que la lectine peut entraîner une rigidification de la membrane du GR et ainsi perturber l'écoulement du sang dans les canaux [EVA 84]. Pour accrocher les GR, il est impossible d'utiliser le rhésus ou le groupe sanguin puisque la définition du rhésus est fondée sur des protéines en solution tandis que, pour les groupes sanguins, il existe deux sortes d'antigènes de surface qui sont présents ou non selon le groupe sanguin.

Pour le cas des GB : différentes molécules peuvent être utilisées. L'adhésion peut se faire avec la sélectine et l'intégrine, molécules toutes deux impliquées dans la cascade

leucocytaire* [CHA 05]. Une autre méthode, plus fréquemment utilisée, consiste en l'utilisation d'Ac ciblés contre les protéines membranaires des GB. Le grand intérêt de cette technique est l'existence de marqueurs spécifiques pour chaque type de GB (lymphocytes, monocytes...) mais aussi pour les cellules cancéreuses. De façon générale, l'adhésion des cellules sanguines par interaction Ac/Ag sera détaillée davantage dans le Chapitre 9.

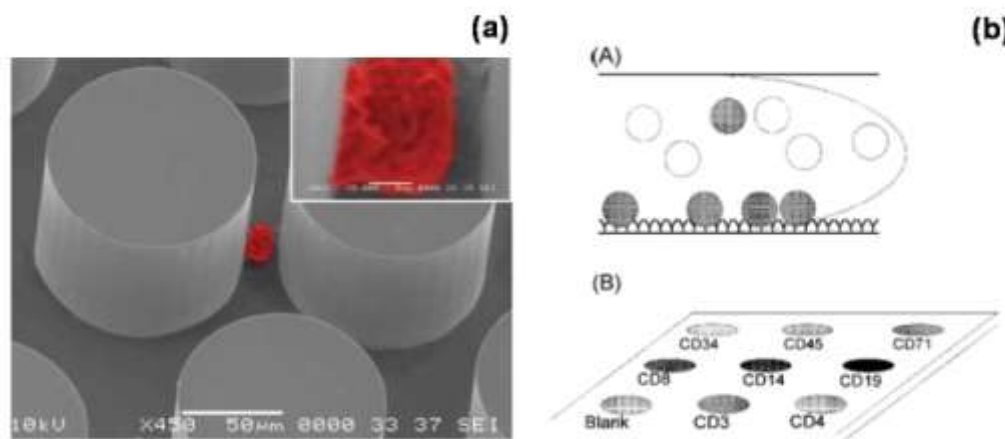


Figure III.15 : Capture spécifique des cellules sanguines. (a) Extraction d'une cellule tumorale circulante, à partir de sang complet, par capture spécifique sur piliers [NAG 07]. (b) Schématisation de stratégies de séparation cellulaire par capture spécifique [PAP 07]. (A) Accroche en flux d'un type cellulaire donné. (B) Puce à cellules, constituée de plusieurs plots de sondes pour accrocher différentes cellules sanguines.

Les adhésions mises en cause peuvent être réversibles ou irréversibles. Dans le premier cas, un décrochage des cellules est possible après fixation, en modifiant les conditions extérieures (principalement le flux [MUR 04] mais aussi la température, le tampon). Cette réversibilité permet une rétention provisoire et sélective d'un type cellulaire donné (comme un ralentissement) et permet de récupérer les cellules en flux par la suite. Dans le second cas, un décrochage est plus difficile après fixation car l'adhésion est plus forte. Les cellules sont donc capturées de manière localisée et ne peuvent plus être remises en flux.

Ces méthodes permettent généralement d'obtenir une fixation cellulaire rapide, forte, efficace et par ailleurs spécifique dans le cas des interactions Ac/Ag. Cette technique permet d'isoler des types cellulaires précis, voire rares, comme les cellules cancéreuses [NAG 07]. La grande variable inconnue de cette technique est l'activation de la cellule lors de son adhésion, dont l'évaluation et l'ampleur font débat [LYO 07].

C.2.6. Les billes magnétiques fonctionnalisées

Comme expliqué dans le Chapitre 2, la fonctionnalisation de billes magnétiques avec des anticorps dirigés contre les protéines surfaciques des cellules ciblées (ou MACS) s'avère très efficace et de plus en plus utilisée. La technique microMACS, elle, intègre en microsystème l'utilisation macroscopique de ces billes avec les avantages inhérents à ce changement d'échelle. La sélectivité de la séparation magnétique est accentuée par la force d'interaction de la reconnaissance Ac/Ag tandis que la miniaturisation des aimants

* La cascade leucocytaire est un processus de réaction à une inflammation.

et leur localisation plus proche des cellules permet un rendement d'accroche meilleur qu'en macrosystème.

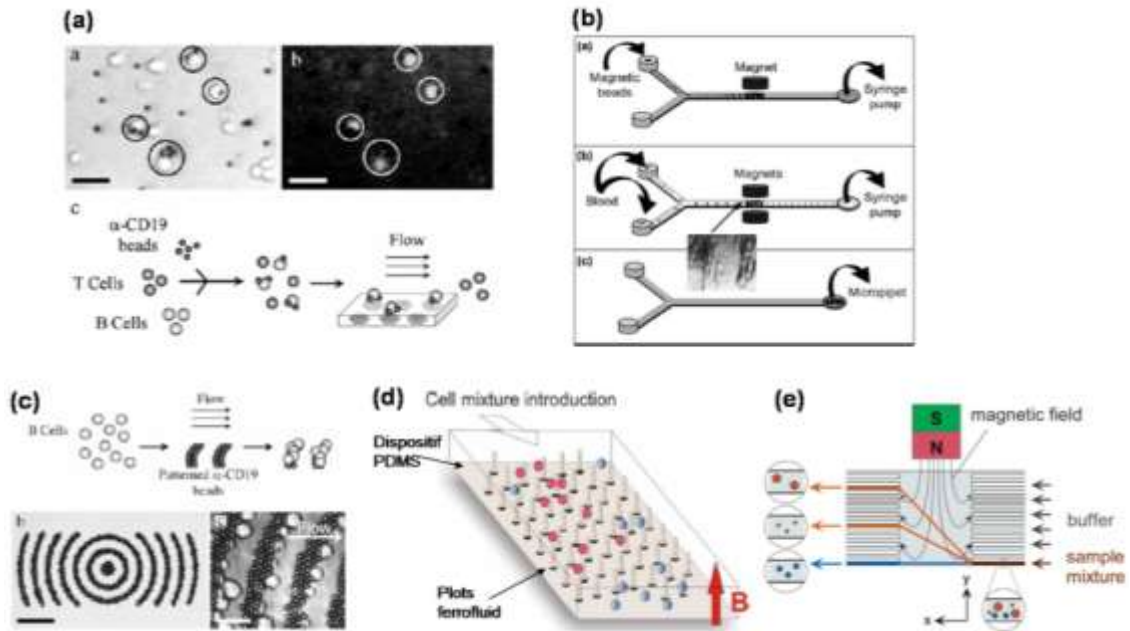


Figure III.16 : Capture spécifique des cellules sanguines par microMACs (Magnetic Cells Sorting).
 (a) Lymphocytes B et T incubés en présence de billes anti-B puis capture en flux [PRE 06]. Photographie en fluorescence montrant la spécificité de l'accroche des billes sur les lymphocytes B.
 (b) Expériences immuno-magnétiques de [FUR 04] et principe général de l'extraction des lymphocytes T dans une intersection en Y. (c) Fixation des billes magnétiques fonctionnalisées puis capture en flux des cellules sur ces billes [PRE 06]. (d) Arrangement en réseaux de piliers des billes magnétiques fonctionnalisées puis capture en flux des cellules sur ces billes [SAI 08]. (e) Séparation magnétique continue proposée dans [PAM 04]. Les particules magnétiques sont déviées selon leur taille et leurs propriétés magnétiques.

L'accroche spécifique cellules/billes se fait généralement en dehors de la puce, puis le mélange est injecté dans le dispositif et les cellules accrochées aux billes magnétiques sont retenues par l'aimant. Dans [TIB 02], l'isolation des GB se fait sur des billes fonctionnalisées anti-CD45 de diamètre 175nm. Puis les billes sont attirées le long de lignes ferromagnétiques de Ni. Dans [PRE 06], des lymphocytes B sont extraits d'un mélange de lymphocytes T et B (Figure III.16.a). Une solution parallèle consiste à injecter les billes magnétiques, les retenir puis seulement après injecter l'échantillon. C'est la solution illustrée dans les Figure III.16.b et c, qui évite l'étape préliminaire de mélange. Dans la Figure III.16.b, les billes fonctionnalisées sont bloquées dans la zone de capture, du sang complet est injecté, les lymphocytes T ciblés s'accrochent aux billes puis sont lysés en vue d'études PCR [FUR 04]. Différentes géométries de zones de capture ont été essayées afin d'avoir un rendement d'accroche optimal. Citons également les travaux originaux de Saias et col. [SAI 08], qui accrochent les billes magnétiques en lignes verticales afin de former une chambre à piliers fonctionnalisés amovibles avant l'injection de l'échantillon (Figure III.16.d).

En parallèle, certains travaux de Pamme et col. [PAM 04] ou Xia et col. [XIA 06] visent à rendre cette technique continue. Comme expliqué dans le schéma de la Figure III.16.e, un mélange de billes magnétiques est injecté avec un flux laminaire. Selon leurs

dimensions et leurs propriétés magnétiques, les billes sont plus ou moins déviées de leur trajectoire par le champ magnétique appliqué et collectées dans différents canaux.

Ainsi, les billes magnétiques fonctionnalisées sont très utiles dans certains cas, par exemple pour l'isolation d'un type cellulaire précis voire rare comme des cellules cancéreuses. La fonctionnalisation permet d'avoir une fixation rapide, spécifique et efficace. Néanmoins l'utilisation de ces billes nécessite une étape supplémentaire de mélange et/ou d'injection et un procédé de microfabrication intégrant la partie aimantée. De plus, certains problèmes d'agrégation difficilement maîtrisée peuvent intervenir. Il est également possible que la cellule soit activée par l'adhésion.

C.2.7. La lyse sélective intégrée

Sethu et col. ont appliqué en microsystème le principe de lyse sélective macroscopique (Chapitre 2) afin d'extraire les GB. La géométrie du dispositif [SET 04] puis également les microstructures placées au fond du canal [SET 06] permettent une rapide diffusion ionique et l'exposition de chaque cellule à des conditions similaires (Figure III.17.a et b). En sortie, du PBS est injecté pour restaurer les conditions isotoniques adéquates. Les GB sont ainsi stressés et activés le moins possible pour que l'analyse génomique ne soit pas perturbée. A 20 μ L/min, 0,6mL de sang complet sont analysés en 30min. Les cellules sont en contact avec l'eau déionisée durant 10sec. Après passage dans le microsystème, il ne reste plus de GR et 25% de GB sont extraits en plus que dans le protocole de lyse classique en tube (Figure III.17.c).

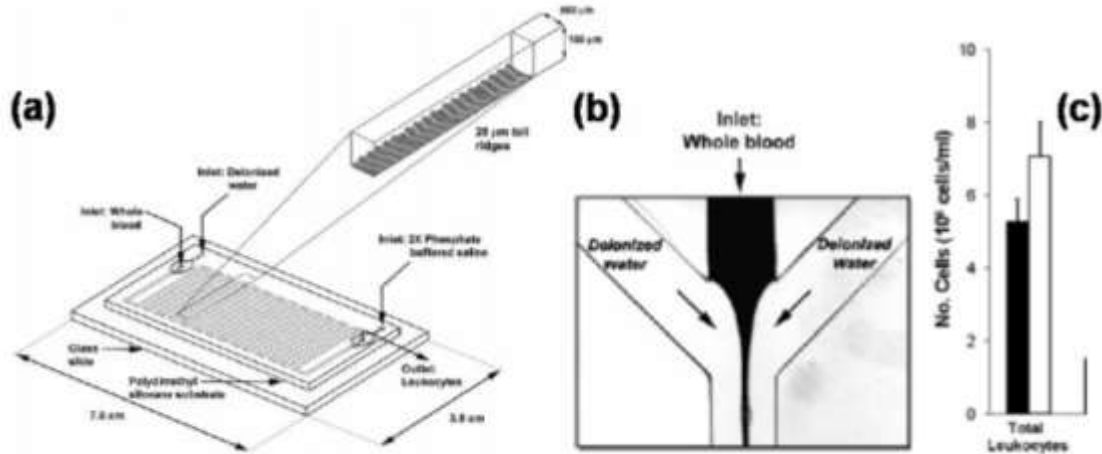


Figure III.17 : Lyse sélective intégrée proposée par [SET 06]. (a) Schéma d'ensemble du dispositif et zoom sur la structure interne du microcanal, pour un mélange chaotique et une distribution cellulaire uniforme. (b) Gainage de l'échantillon sanguin par le tampon de lyse afin d'augmenter la surface d'échange et donc la diffusion. (c) Quantité de GB extraits par lyse hypotonique. Lyse en tube (en noir, protocole BD FACSLyse) versus lyse en microsystème (en blanc).

Cette lyse sélective a également été intégrée par SooHoo et col. dans [SOO 07] mais avec des rendements inférieurs. L'idée proposée, cependant originale, est fondée sur la diffusion des réactifs, en solution dans du Polyéthylène Glucol, vers les cellules du sang. Celles-ci sont en solution dans du Dextran et les deux phases porteuses sont non miscibles. Ce principe s'appelle l'ATPS (Aqueous Two Phase System).

Cette technique semble très efficace pour l'extraction des GB. Elle a l'avantage de pouvoir se faire sur sang complet non dilué, avec une bonne efficacité et un débit rapide. L'instrumentation nécessaire est simple. Par contre, en sortie du dispositif, les GB sont encore plus dilués qu'en entrée. Par ailleurs, cette technique n'est pas du tout adaptée à la séparation du plasma. Pour rappel, la lyse sélective est généralement utilisée sur buffy coat, c'est-à-dire après une première séparation cellules/plasma par centrifugation. Dans la perspective d'un fractionnement total, cette technique pourrait donc être utilisée pour extraire les GB mais une fois le plasma récupéré.

C.3. Le biomimétisme

Le biomimétisme est une adaptation particulière de l'hydrodynamique, qui tire profit de certains phénomènes fluidiques ayant lieu en micro vascularisation sanguine et expliqués dans le Chapitre 1. Ces phénomènes sont exploités dans des microsystèmes en vue de la fragmentation du sang.

✓ *Ecrémage et extraction microfluidique du plasma* : Le phénomène d'écramage est très utilisé pour la fragmentation sanguine en microsystème, où l'utilisation de petites bifurcations suffit à récupérer du plasma de très bonne pureté [PAR 05, YAN 06]. La géométrie en « sommet coin » de [PAR 05] donne une séparation à 99% pour un débit de 50nL/min (Figure III.18.a). Une efficacité analogue mais à des débits allant jusqu'à 4 μ L/min est obtenue par Yang et col. dans [YAN 06] qui utilisent des canaux perpendiculaires (Figure III.18.b).

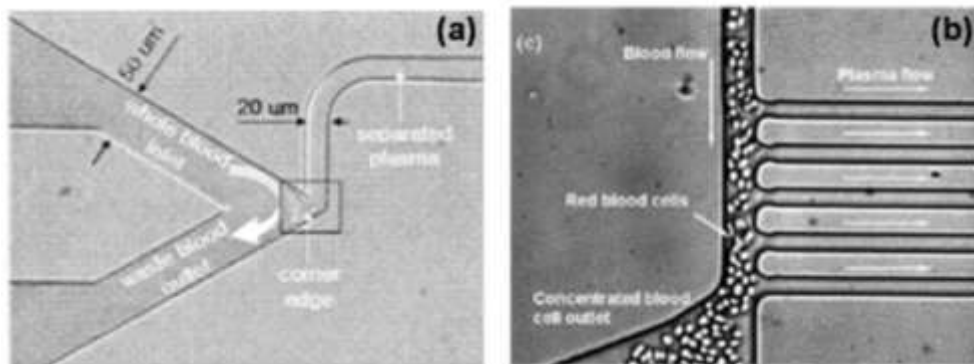


Figure III.18 : Application du phénomène d'écramage à l'extraction du plasma en microsystème. (a) Bifurcation en coin [PAR 05]. (b) Bifurcation perpendiculaire [YAN 06].

✓ *Migration et extraction microfluidique des GB* : Shevkoplyas et col. [SHE 05] accentuent le phénomène de margination des GB par le dimensionnement des canaux : la profondeur est mise à 10,3 μ m sachant que le diamètre moyen d'un GB est de 10-12 μ m. Les GB voient leur déplacement restreint : leur migration suite à des collisions GR/GB est alors imposée de façon latérale. Les résultats montrent bien un déplacement progressif des GB vers les parois (Figure III.19) : le ratio GB/GR passe de 1:1100 à 1:32 dans le canal final de récupération (en pL/sec).

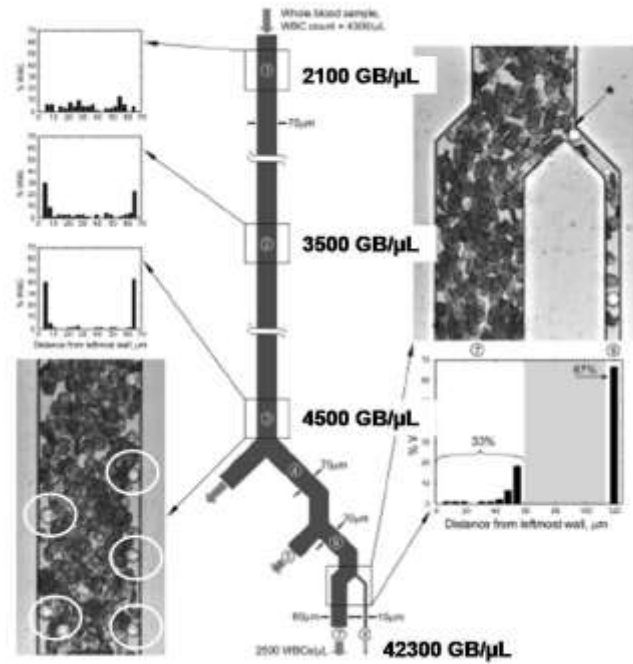


Figure III.19 : Migration progressive des GB vers les parois du canal principal et enrichissement en GB des canaux secondaires [SHE 05] par biomimétisme. Les ronds blancs ajoutés sur le canal en bas à gauche permettent de visualiser des GB ayant migré vers les parois.

✓ *Cascade d'adhésion des GB* : Une autre possibilité consiste à fonctionnaliser les microplots avec des molécules d'adhésion bien spécifiques. Chang et col. [CHA 05] reproduisent le processus physiologique d'adhérence des GB sur les parois des vaisseaux sanguins en fonctionnalisant les microstructures avec une protéine d'adhésion, la sélectine-E. Deux géométries de plots sont testées et comparées : des piliers carrés et alignés ou des piliers ovales et décalés (Figure III.20). A même débit ($0,1 \mu\text{L}/\text{min}$), les piliers ovales récupèrent 95% des cellules d'intérêt et les carrés, 72%. On peut également citer les résultats d'Agrawal et col. [AGR 08], qui comparent ces différentes molécules d'adhésion pour accrocher les neutrophiles à partir de sang complet

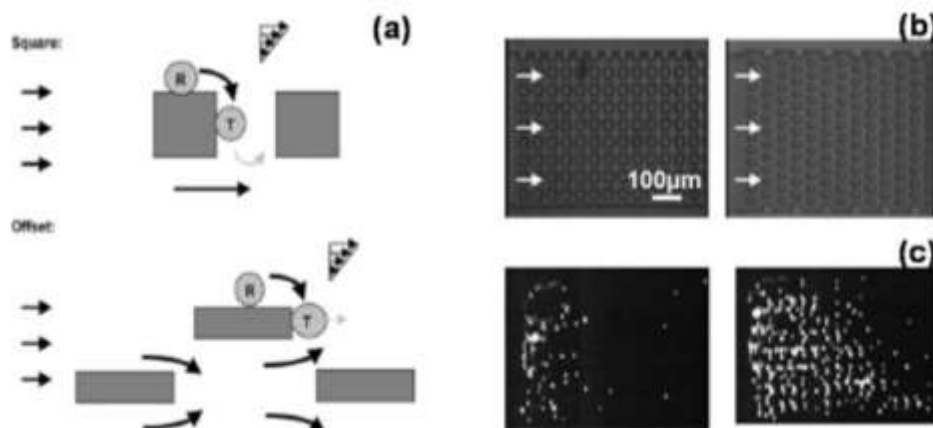


Figure III.20 : Adhésion des GB et biomimétisme, d'après [CHA 05]. (a) Géométrie des piliers proposés, carrés ou rectangulaires. (b) Observation en lumière blanche d'une injection. (c) Observation en fluorescence de la même injection et visualisation des cellules adhérentes.

Ces techniques mimétiques ne nécessitent pas l'application d'une force physique autre que celle induite par l'écoulement : les cellules ne sont donc ni perturbées ni activées et restent en flux. Ces principes de séparation sont simples, ne requièrent pas d'instrumentation complexe et fournissent un bon rendement (un ratio GB/GR augmenté d'un facteur 30 pour [SHE 05]). Mais surtout ils ont l'avantage de s'appliquer sur du sang complet, sans dilution. Le seul inconvénient est, dans la plupart des systèmes, un débit un peu lent bien que l'on puisse intégrer plusieurs motifs en parallèle sur une même puce.

C.4. Evaluation comparative des différentes techniques de microfractionnement sanguin

Les techniques de microfractionnement sanguin considérées s'attachent à l'extraction du plasma ou au tri cellulaire mais jamais aux deux simultanément. En effet, une technique de séparation peut être efficace pour le plasma mais pas adaptée aux cellules et réciproquement. Il a donc fallu comparer l'efficacité de toutes ces techniques en tenant compte de l'opération de fractionnement ciblée : plasma ou cellules. A cet effet, deux tableaux comparatifs permettent de présenter une vision plus synthétique de ce travail, en récapitulant les différents principes, quelques données importantes les concernant, leurs points forts et leurs points faibles. Le Tableau III-1 présente les techniques pour l'extraction du plasma et le Tableau III-2 celles pour le tri cellulaire.

Principe		Critères de ségrégation	Publication	Débit	Rendement	+ et -
Microfiltration		Taille	[VAN 06]	0,65µL/min	10%	+ : passif, portable, continu - : colmatage, hémolyse, dilution importante.
Hydro.	Hydrophorèse	Taille	[CHO 07.3]	4µL/min	40% (1:4)	+ : passif, portable, continu - : débits lents, dilution importante
	FD	Taille	[YAN 06]	10µL/h	15-25%	
Plateforme CD en rotation		Densité	[HAE 06]	5µL/20sec	2µL/5µL = 40%	+ : efficace, aucune dilution - : discontinu, système de rotation non intégrable
DEP		Prop. électriques	[NAK 07]	?	? (1:10)	+ : efficace (?) - : adsorption non spécifique des protéines, intégration électrodes
Acoustique		Densité et compressibilité	[NIL 06]	600µL/min	?	+ : efficace, en continu, rapide, - : intégration piézo

Tableau III-1 : Comparaison des techniques d'extraction du plasma en microsystèmes.

Principe		Critères de ségrégation	Publication	Débit	Rendement	+ et -
Microfiltration		Taille	[JI 06]	10µL/min	60 à 95% GR vs 70 à 95% de GB (d=1:200)	+ : passif, portable, continu - : colmatage, hémolyse, dilution importante
			[SET 06.2]	5µL/min	50% de GR vs 97% de GB	
Hydro.	Hydrophorèse	Taille	[CHO 07.4]	1µL/min	85% de GB	+ : passif, portable, continu - : débits lents, dilution importante
	PFF	Taille	[TAG 07]	20µL/h	80% de GR	
	Biomimétisme	Taille	[SHE 05]	16pL/sec	GB/GR de 1/1100 à 1/32	
DLD		Taille	[DAV 06]	1µL/h	100% de GB vs 99% de GR	+ : efficace, sélectif, continu - : débits lents, dilution, résolution de la fabrication
DEP		Prop. électriques	[HAN 08]	50µL/h	87% de GR vs 92% de GB (1.5)	+ : efficace - : nécessité d'une tension, adhésion non spécifique, intégration électrodes
Magnétophorèse		Susceptibilité magnétique	[HAN 06.2]	0,5µL/h	94% de GR vs 97% de GB	+ : séparation en flux continu, efficace - : étape de désoxygénation des GR, dilution, intégration partie ferromagnétique
Acoustique		Densité et compressibilité	[PET 06]	?	96% de GR vs 92% de PLT	+ : efficace, rapide, en continu - : ajout d'un milieu de contraste, dilution
Optique		Fluorescence OU Indice réfraction + Taille	[MAC 03]	?	95%	+ : précis, sélectif, aucune contrainte sur la cellule - : système encombrant, lent, dilution nécessaire
Molécule d'adhésion et microMACS		Antigènes exprimés	Rien sur tri GR vs GB mais tout à fait envisageable : sur surface mobile ou sur en continu sur billes magnétiques			+ : spécifique, efficace, possible en continu - : cellules activées ?
Lyse sélective		Résistance au choc osmotique	[SET 06]	20µL/min	0 GR vs 25% de GB en plus /l à technique macro	+ : efficace, continu - : cellules activées ?

Tableau III-2 : Comparaison des techniques de tri cellulaire en microsystèmes.

Différents principes de fragmentation sanguine ont été présentés : la filtration, l'hydrodynamique, la centrifugation, la sélection magnétique ou diélectrophorétique, l'acoustique, en passant par des procédés davantage biochimiques... Certaines techniques sont beaucoup plus avancées que d'autres, plus efficaces, plus rapides ou plus récentes, plus adaptées à telle ou telle analyse ultérieure, mais pour le moment

aucune ne s'impose vraiment. Par ailleurs, aucun microsystème présenté n'est en mesure de faire la séparation plasma / GB / GR, qui plus est sans dilution du sang.

L'argument de l'encombrement est un paramètre important à considérer par rapport à notre cahier des charges ; ainsi les systèmes optiques sont difficilement transportables. L'ajout d'éléments actifs dans le microsystème, tels que les électrodes pour la DEP ou la partie ferromagnétique pour la magnétophorèse, est également un point négatif qui complexifie la microfabrication. Pour la même raison technologique, la nécessité de dimensions restrictives pour la microfiltration ou le DLD est un point bloquant. Pour l'ensemble de ces raisons, la microfluidique passive apparaît comme une piste intéressante à développer.

En parallèle, la capture par affinité est une des seules techniques permettant un tri sélectif des différents types cellulaires sans ajout de parties actives au microsystème. Par rapport à notre cahier des charges, c'est également une technique qui mériterait d'être développée davantage.

C.5. Conclusion et perspectives

A l'issue de cet état de l'art des techniques de fractionnement sanguin en microsystème, il apparaît que de nombreuses techniques existent. Néanmoins aucune ne permet de satisfaire pleinement notre besoin de fractionnement global, continu et facilement intégrable en labopuce.

Les techniques ont toutes fortement évolué depuis le début de cette thèse et deviennent compétitives. Les évolutions communément observées sont tout d'abord l'adaptation de ces principes afin de permettre une séparation en continu, puis également le couplage de plusieurs de ces méthodes afin d'augmenter le rendement, la sélectivité ou la durée de la séparation. Cependant la conclusion demeure la même : les techniques considérées concernent très souvent des petits volumes d'échantillon, fortement dilués et injectés à des débits très faibles. Aucune technique ne permet un fractionnement global, en continu et pour un volume important.

Cette étude bibliographique nous a poussés vers la microfluidique passive pour l'extraction du plasma et vers la capture spécifique par interactions Ac/Ag pour le tri cellulaire. Ce choix, qui comporte certes une part d'arbitraire, a tout d'abord été motivé par un souci de simplicité technologique ; une fabrication simple, rapide et un système passif intégrable à court terme dans un LOC. Le second argument en faveur des deux solutions choisies est leur cohérence avec nos compétences et les savoir-faire qui peuvent être mobilisés au sein du laboratoire ou du département. Le développement de solutions fondées sur la microfluidique passive sera abordé dans la Partie 3, tandis que la mise en place d'une capture cellulaire spécifique sera présentée dans la Partie 4.

IV. Matériels, méthodes de caractérisation et de validation

Ce chapitre aborde les aspects pratiques et expérimentaux qui sont spécifiques à l'utilisation de microsystèmes pour le sang. Par exemple, l'injection de sang dans un microsystème nécessite des techniques qui diffèrent des techniques macroscopiques. L'apprentissage de ces méthodes qui vont être exposées s'est partiellement mis en place au cours de l'évaluation de techniques classiques de microfluidique passive présentées dans le Chapitre 5. Mais il est bien évident qu'elles ont principalement servi de fondements pour le développement de nos propres dispositifs, présentés dans les Chapitres 6 et 7.

Dans une première section, nous passons en revue le sang et les différents modèles physiques successivement utilisés. Une seconde section décrit les procédés de fabrication de nos microsystèmes ainsi que le banc expérimental qui a été mis en place. Enfin, une troisième section discute du développement des méthodes de caractérisation et de validation de nos dispositifs.

A. Modèles physiques considérés

L'approvisionnement du sang humain a été un point délicat au début de ce travail. Le sang véhicule un nombre important de pathologies, ce qui engendre des contraintes de sécurité importantes. Il est ainsi nécessaire de s'assurer d'un approvisionnement fiable et valide, ou encore de disposer de l'autorisation légale de manipuler du sang humain dans l'enceinte d'un laboratoire du CEA.

C'est pourquoi, suivant les expériences réalisées, différents modèles physiques du sang humain ont été utilisés. Tout d'abord les billes fluorescentes permettent d'obtenir rapidement un modèle très simplifié des cellules sanguines, d'autant plus qu'il est possible d'utiliser différentes tailles et densités de billes, selon que l'on veut mimer les PLT, les GR ou les GB. Mais ce modèle reste très approximatif. Un second modèle plus réaliste, le sang de cochon, a été utilisé et a permis d'explorer le caractère déformable des cellules et ainsi d'augmenter la complexité du modèle. Mais du fait de la mauvaise qualité des prélèvements et de la difficulté à marquer les cellules de façon spécifique, nous sommes ensuite passés au sang humain. Ce chapitre présente successivement ces différents échantillons.

A.1. Billes fluorescentes

Les billes de 3, 5 et 10 μ m permettent de mimer grossièrement différentes cellules sanguines. Ayant des dimensions et des densités comparables respectivement aux PLT, GR et GB, ce modèle a cependant ses limites puisqu'il ne tient compte ni de la forme

des cellules (en particulier le caractère ellipsoïde des GR) ni de leur déformabilité. C'est donc un modèle élémentaire mais cependant bien pratique (aucun problème de sécurité ou d'approvisionnement) qui a permis de réaliser toutes les premières expériences.

Les billes de 0,5µm, petites, sphériques et rigides, ne sont pas - ou peu - soumises à certaines forces telles que les forces de portance abordées au Chapitre 6. Ajoutées en petite quantité dans un échantillon sanguin (à $7.10^4/\mu\text{L}$ dans du sang dilué au 1:20), elles permettent donc de visualiser l'écoulement sans le perturber. Toutes ces billes sont diluées à la concentration voulue dans du PBS 1X (Sigma). Le Tableau IV-1 ci-dessous en présente un récapitulatif.

Billes	0,5 µm	3 µm	5 µm	10 µm
Fabricant	Invitrogen Molecular Probes	Duke Scientific	Duke Scientific	Invitrogen Molecular Probes
Concentration initiale	$1,5.10^8 /\mu\text{L}$	$7.10^5 /\mu\text{L}$	$1,4.10^5 /\mu\text{L}$	$3,6.10^3 /\mu\text{L}$
Densité volumique	1,06 g/cm ³	1,05 g/cm ³	1,05 g/cm ³	1,062 g/cm ³
$\lambda_{\text{excitation}}$	468 nm	468 nm	468 nm	625 nm
$\lambda_{\text{émission}}$	508 nm	508 nm	508 nm	645 nm

Tableau IV-1 : Caractéristiques des billes fluorescentes utilisées. $\lambda_{\text{excitation}}$ et $\lambda_{\text{émission}}$ correspondent aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission des fluorophores utilisés, c'est-à-dire le FITC* et le Cy5**. Les billes de 0,5µm sont des billes « traceurs » de l'écoulement, tandis que les billes de 3, 5 et 10µm modélisent les cellules sanguines.

A.2. Sang de cochon

Les premiers échantillons sanguins injectés en microsystème sont issus de prélèvements effectués sur des cochons au moment de leur abattage aux abattoirs de Saint-Egrève. En raison de cet environnement, et bien que le sang soit récupéré dans des tubes BD traités à l'EDTA, il n'est pas possible de le collecter en respectant les rapports volumiques adéquats. C'est pourquoi il comporte de nombreux caillots. Il est donc nécessaire d'enlever ces caillots avant l'injection, ce qui modifie l'hématocrite ainsi que la viscosité de l'échantillon. Par ailleurs, la visualisation des cellules est impossible ; un marquage spécifique avec des Ac couplés FITC est impossible car il n'existe pas dans le commerce d'Ac qui ciblent les antigènes du cochon. Pour toutes ces raisons, ce type d'échantillon nous a été d'une grande utilité avant l'utilisation de sang humain mais doit rester une solution de substitution.

* FITC = Fluorescein Iso Thiocyanate.

** Cy5 = Cyanine.

A.3. Sang humain

Dans un deuxième temps, afin de s'affranchir de tous ces problèmes, une habilitation officielle à manipuler le sang humain dans l'enceinte du laboratoire a permis de passer à du sang humain contrôlé. Une pièce dédiée a été mise en place et une convention officielle a été établie, avec des règles d'utilisation, de nettoyage et d'évacuation des déchets.

Les échantillons sont prélevés par l'EFS (Etablissement Français du Sang, Rhône Alpes), sur des donneurs volontaires sains, dans des tubes BD traités avec des anticoagulants (EDTA, Citrate ou Héparine). Selon l'expérience, le sang est dilué avec du tampon PBS pour avoir différentes dilutions.

Par ailleurs, pour des questions de sécurité, il nous est imposé d'attendre la sérologie de chaque échantillon avant de pouvoir l'utiliser ; il en résulte un délai de deux jours. En pratique, une fois prélevés, les échantillons de sang total restent donc à 4°C dans leur tube de prélèvement pendant deux à trois jours avant leur utilisation. Cette attente est à prendre en compte dans ce travail car le vieillissement de l'échantillon a des conséquences biologiques non négligeables, en particulier pour les PLT (problème d'agrégation), et nous limite ensuite à une utilisation de l'échantillon pendant deux jours uniquement.

A.4. Buffy Coat

Du fait de la faible concentration des GB dans l'échantillon sanguin, il est nécessaire dans certains cas de travailler à partir d'une solution intermédiaire de plasma fortement enrichie en GB.

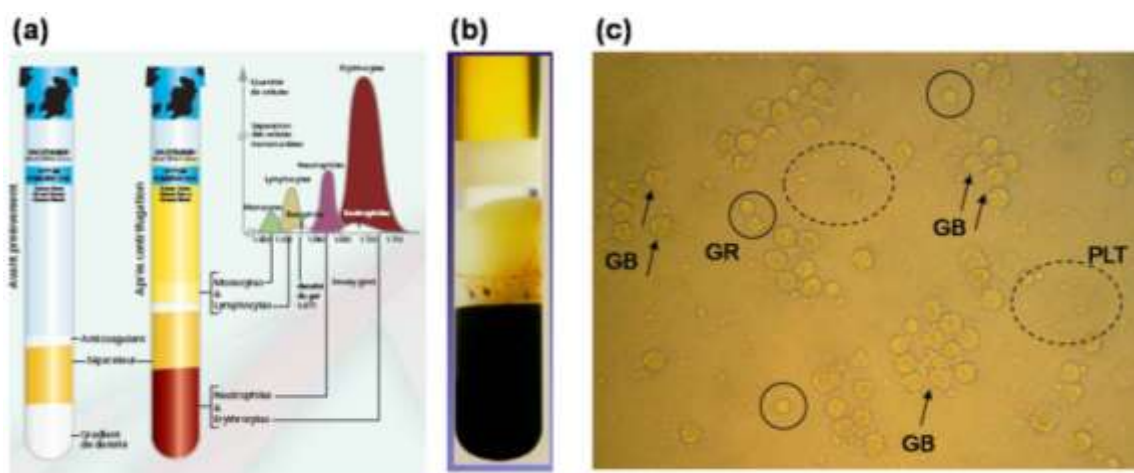


Figure IV.1 : Caractéristiques du buffy coat. (a) Principe du tube CPT Vacutainer de BD. (b) Photographie d'un tube après centrifugation. (c) Observation d'un buffy coat avec quelques GB indiqués par des flèches, les GR entourés d'un trait plein et les PLT entourées d'un trait en pointillés.

Les expériences sont ainsi conduites à partir d'un buffy coat qui, comme expliqué dans le Chapitre 2, correspond à une phase du plasma enrichie en GB après centrifugation.

Dans un souci de simplification du protocole, le buffy coat est obtenu à l'aide du tube CPT Vacutainer de BD. Comme expliqué sur les Figure IV.1.a et b, ce tube contient un séparateur de plasma et un gradient de densité, ce qui va permettre la séparation par centrifugation des cellules mononuclées (les lymphocytes et les monocytes) du plasma et du culot cellulaire. Le protocole est le suivant : le sang est versé dans le tube, homogénéisé et centrifugé 20min, à température ambiante et à 1500g. Les lavages successifs au PBS recommandés par BD ne sont pas appliqués, afin de gagner du temps et d'éviter toute agrégation éventuelle des GB suite à ces centrifugations successives. Notons qu'il n'est pas indispensable ici d'avoir une solution totalement et parfaitement dépourvue de GR. Un exemple de buffy coat obtenu est présenté dans la Figure IV.1.c tandis que davantage de détails sur cette technique sont disponibles en Annexe 1.

B. Microsystèmes et microfluidique

B.1. Fabrication des microsystèmes

Comme présenté dans le Chapitre 3, il existe de nombreuses méthodes de fabrication de microsystèmes fluidiques. Deux d'entre elles ont été appliquées au cours de ce travail de thèse et font l'objet d'une rapide description de principe ; la technologie polymère et la technologie silicium. La fabrication silicium est au cœur des compétences du laboratoire. Mais le déménagement de la salle blanche au début de cette thèse a fortement limité la possibilité de fabrication de lots silicium. C'est pourquoi une partie de ce travail a consisté à mettre en place de manière systématique une filière de prototypage rapide en PDMS, afin de tester rapidement un grand nombre de géométries. Chacune de ces techniques possède ses avantages et ses inconvénients ; leur intérêt d'utilisation, spécifique, sera discuté dans ce chapitre.

B.1.1. Technologie polymère

La fabrication PDMS utilise les techniques classiques de lithographie douce. Le protocole utilisé est illustré par la Figure IV.2, d'après Mc Donald et col. [MAC 02].

La géométrie souhaitée est tout d'abord dessinée sur ordinateur à l'aide du logiciel Freehand puis imprimée sur un masque souple : le photomasque (Xyrius). Un film sec de résine photosensible (Ordyl, Elga Europe) est ensuite laminé sur une plaque de silicium, sachant que l'épaisseur du film déterminera la profondeur des canaux fluidiques (ici 100 μ m). Cet ensemble est insolé au travers du photomasque puis développé (A). Les murs de ce moule microstructuré, correspondant aux parties non développées, permettront de former les canaux lors du moulage.

Le PDMS est préparé à partir d'un mélange de polymère et d'agent réticulant (ratio 5/1, kit Sylgard 184, Silicon Elastomer, Dow Corning). Ce mélange est versé sur le moule précédent (B) puis dégazé à l'aide d'une cloche à vide pendant 45min et enfin réticulé à 65°C pendant 1h. Le motif en PDMS peut alors être démoulé facilement (C).

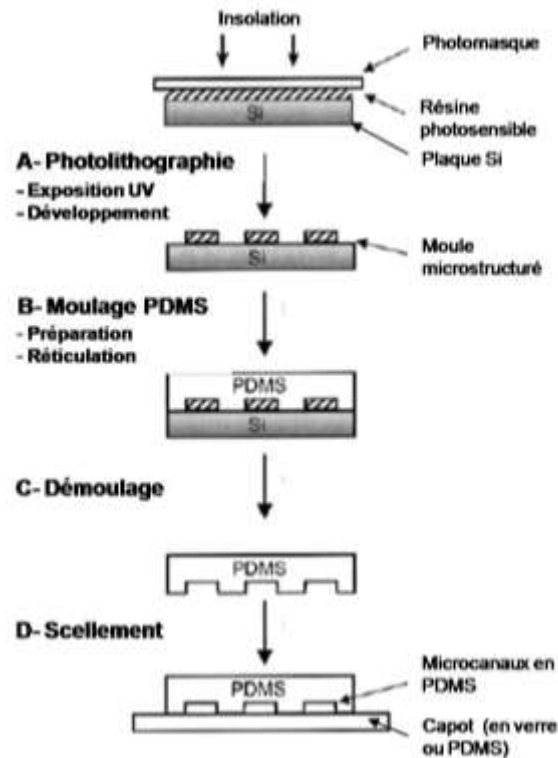


Figure IV.2 : Principe de fabrication d'un système microfluidique en PDMS, d'après Mac Donald et col. [MAC 02]. 1- Un film sec de résine photosensible est déposé sur une plaque de silicium (le wafer). 2- Une exposition UV est réalisée sur ce film au travers d'un masque souple et permet, après développement, d'obtenir le moule (ou master) (A). 3- Le PDMS peut ensuite être coulé sur le moule et réticulé (B) puis démoulé (C). 4- L'ajout d'un capot en PDMS ou en verre permet de fermer les canaux (D).

L'utilisation du PDMS pour les microsystèmes fluidiques a de nombreux avantages. Le PDMS est optiquement transparent. Sa fabrication est simple, rapide (de l'ordre de 1 à 2 semaines dans nos conditions), avec un faible coût, et permet la conception de nombreuses puces identiques à partir d'un moule unique. Le PDMS est également perméable à l'air [FOL 00], ce qui peut s'avérer utile lorsque des bulles d'air sont emprisonnées dans les canaux. Cependant, du fait de son faible module d'élasticité [GER 06], le PDMS se déforme sous la pression, ce qui peut provoquer des problèmes de stabilité auxquels nous serons confrontés par la suite dans le Chapitre 8. L'importance de la déformation de canaux en PDMS a été rappelée récemment par Hardy et col. [HAR 09], où la chute de pression obtenue à 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ dans des canaux en PDMS est de 35% inférieure à celle obtenue dans des canaux rigides de dimensions identiques. Il est également connu que le PDMS est incompatible avec certains solvants organiques dont l'injection provoque un gonflement du polymère, et que son hydrophobicité engendre une adsorption non spécifique de molécules présentant des domaines hydrophobes comme les protéines [REG 09]. Mais la principale limitation ici concerne les dimensions des motifs. Cette contrainte est inhérente à notre procédé de fabrication du moule et à l'utilisation de films secs de résine. La largeur des canaux ne peut être inférieure à la moitié de leur profondeur. Par exemple, pour $h=100\mu\text{m}$, le canal doit faire au moins $50\mu\text{m}$ de large.

Il en résulte que cette technique est, dans notre cas et nos géométries, particulièrement adaptée pour un prototypage rapide. Elle permet de faire des études préliminaires sur des géométries simples qui peuvent être rapidement modifiées puis, une fois la géométrie optimale obtenue, de passer à une fabrication silicium pour obtenir un dimensionnement plus précis.

B.1.2. Technologie Silicium

Deux lots silicium ont été fabriqués au cours de cette thèse. Le lot FRICS a permis, dès le début de la thèse, d'évaluer et caractériser certains principes de microfluidique passive, comme expliqué dans le Chapitre 5. Le lot BLOD, fabriqué en fin de thèse, a eu pour but de valider certains dispositifs développés en PDMS. Dans ces deux cas, le procédé de fabrication de la plaque support comporte peu d'étapes, une ou deux profondeurs de gravure (une gravure profonde pour le lot BLOD, deux gravures pour le lot FRICS). La filière technologique utilisée lors de la fabrication BLOD est décrite dans la Figure IV.3.

Ces puces sont fabriquées à partir de plaques de silicium, appelées wafer, de diamètre 200mm et d'épaisseur 725 μ m. Cette plaque subit tout d'abord une oxydation thermique à 1100°C (1), formant une couche superficielle de SiO₂ dont l'épaisseur (ici 3 μ m) dépend de la température et du temps passé dans le four, et qui protégera le silicium lors de la gravure des canaux (4). La plaque subit ensuite une photolithographie. Pour cela, une résine photosensible est déposée sur la face avant de la plaque (2) et est insolée par rayonnement UV au travers d'un masque. Le développement permet de faire apparaître les motifs à la surface de la plaque (3). Puis la plaque subit une gravure sèche* (4). Celle-ci permet de retirer le SiO₂ des zones où la résine a été enlevée, zones correspondant à l'emplacement des futurs canaux. Un délaquage permet ensuite de supprimer la couche de résine à la surface de la plaque (5), étape suivie d'une gravure RIE** du silicium (6). La plaque est finalement nettoyée et désoxydée par gravure humide afin de supprimer toute la couche superficielle de SiO₂ (7 et 8). Une nouvelle oxydation permet de redéposer une couche homogène de SiO₂ (0,1 μ m) (9).


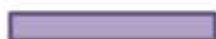





Coupe technologique	Description des étapes
	Silicium 200mm (h=725 μ m)
	(1) Oxydation thermique du substrat (3 μ m, 1100°C)
	(2) Etallement d'une résine photosensible en face avant (1.5 μ m)
	(3) Photolithographie (4) Gravure du SiO ₂ (3 μ m)
	(5) Délaquage de la résine (6) Gravure RIE du Si (200 μ m)
	Nettoyages (7) Oxydation humide (0,5 μ m, 950°C) (8) Désoxydation du SiO ₂ par gravure humide
	(9) Oxydation humide (0,1 μ m, 950°C)

Figure IV.3 : Description générale des étapes de fabrication de la technologie Silicium. Exemple du procédé BLOD, réalisé dans les salles blanches du Leti.

* La gravure sèche SiO₂, anisotrope, consiste à bombarder la plaque à l'aide d'ions contenus dans un plasma (des ions CF₄ ici), qui vont provoquer l'arrachement du SiO₂ par action mécanique.

** La gravure ionique réactive, appelée gravure RIE, est également une gravure sèche qui fonctionne sur le même principe que la gravure SiO₂. Son avantage principal est de permettre d'obtenir des flancs droits dans les canaux microfluidiques.

Comme le PDMS, le silicium a également des points forts et des points faibles. Les plus grands avantages de ce matériau sont la rigidité de ses canaux et les dimensions très petites que ce mode de fabrication autorise. L'environnement technique LETI est également un avantage non négligeable à prendre en compte. En effet, les différents procédés de chaque étape de fabrication sont bien connus en interne et des compétences spécifiques en fonctionnalisation silicium sont également disponibles. Ces raisons en font une technique de choix pour la fabrication éventuelle d'un microsystème fluide, avec en plus la possibilité d'intégrer des fonctions électroniques. Le revers de la médaille de cette technologie de pointe est son coût, beaucoup plus élevé que pour un dispositif PDMS, et bien évidemment les délais de fabrication : un délai minimum de 4 à 5 mois entre le dessin du masque et la livraison des puces. Le lecteur intéressé par plus de détails quant à ce mode de fabrication pourra lire le livre de M. Madou [MAD 02] ainsi que celui de Kohler et col. [KOH 99].

La technologie silicium est donc parfaitement adaptée pour le développement d'un dispositif et sa stabilisation en vue d'une éventuelle industrialisation, après qu'une première version de prototype eut été validée sur PDMS.

B.2. Packaging

Les puces, une fois fabriquées, doivent être emballées*, c'est-à-dire assemblées puis connectées au monde extérieur afin d'être utilisables. La Figure IV.4 représente un exemple du packaging classiquement utilisé au cours de ce travail, aussi bien pour les puces en PDMS que pour les puces en silicium.

La première étape est le scellement. Quelque soit le mode de fabrication des canaux microfluidiques, cette étape est nécessaire afin de fermer les canaux sur leur face supérieure. Elle se fait à l'aide d'un capot, qui peut être en verre, en PDMS ou même en plexiglas.

✓ Pour les puces en silicium utilisées, un capot en verre est scellé sur le support microstructuré à l'aide de procédés divers tels que la sérigraphie, le scellement direct ou anodique**.

✓ Pour les puces en PDMS, les capots utilisés ici sont également en PDMS. Un traitement plasma (20W, 20sec, OAST Products Inc) permet d'activer les surfaces des deux parties, le motif et le capot, puis de les coller de façon irréversible. Une mise en étuve de l'ensemble à 65°C pendant 4h permet de renforcer ce scellement.

L'étape suivante est la mise en place d'une connexion fluide. Sur l'ensemble des puces étudiées, qu'elles soient en silicium ou en PDMS, la connexion se fait par la tranche grâce à l'insertion de capillaires en silice (Photon Line, $\varnothing_{int}=100\mu m$,

* Le terme français, peu ou pas utilisé, est la « mise sous boîtier ».

** Le collage par sérigraphie utilise un tissu finement maillé. La colle passe au travers de ce maillage et se dépose sur le substrat microstructuré avec une épaisseur de quelques μm . Lors d'un scellement anodique, une électrode applique un champ électrostatique à 400°C sur l'assemblage silicium/capot en Pyrex. Sous l'action de ce champ, de très fortes liaisons SiO₂ sont générées à l'interface des deux matériaux et permettent un collage très efficace, dépendant peu des caractéristiques de la surface. Le scellement direct consiste à mettre en contact deux plaques (silicium et capot en verre) ne présentant aucune impureté (parfaitement polies et nettoyées) et à les rapprocher jusqu'à ce que des forces d'attraction du type Van der Waals se créent et génèrent une onde de collage. Un recuit à haute température permet de transformer les liaisons déjà formées en liaisons covalentes, beaucoup plus fortes.

$\varnothing_{\text{ext}}=170\mu\text{m}$, $L=5\text{cm}$) dans les entrées/sorties microfluidiques de la puce. Une fois insérés, ces capillaires sont collés. La colle (Vitraltit) pénètre à l'intérieur du canal par capillarité puis subit une réticulation par rayonnement UV. Un tube en tygon (Tygon, MasterFlex, $\varnothing_{\text{int}}=380\mu\text{m}$, $\varnothing_{\text{ext}}=2230\mu\text{m}$, $L=15\text{cm}$) est collé à l'extrémité des capillaires d'entrée afin de permettre la connexion d'une aiguille. Il est important que les capillaires de chaque sortie aient les mêmes longueurs et diamètres. Dans le cas contraire, ils n'auraient pas la même résistance fluide et donc pas les mêmes pertes de charges, ce qui déstabiliserait l'écoulement. Les difficultés de ce mode de connexion par la tranche seront abordées dans le Chapitre 11.

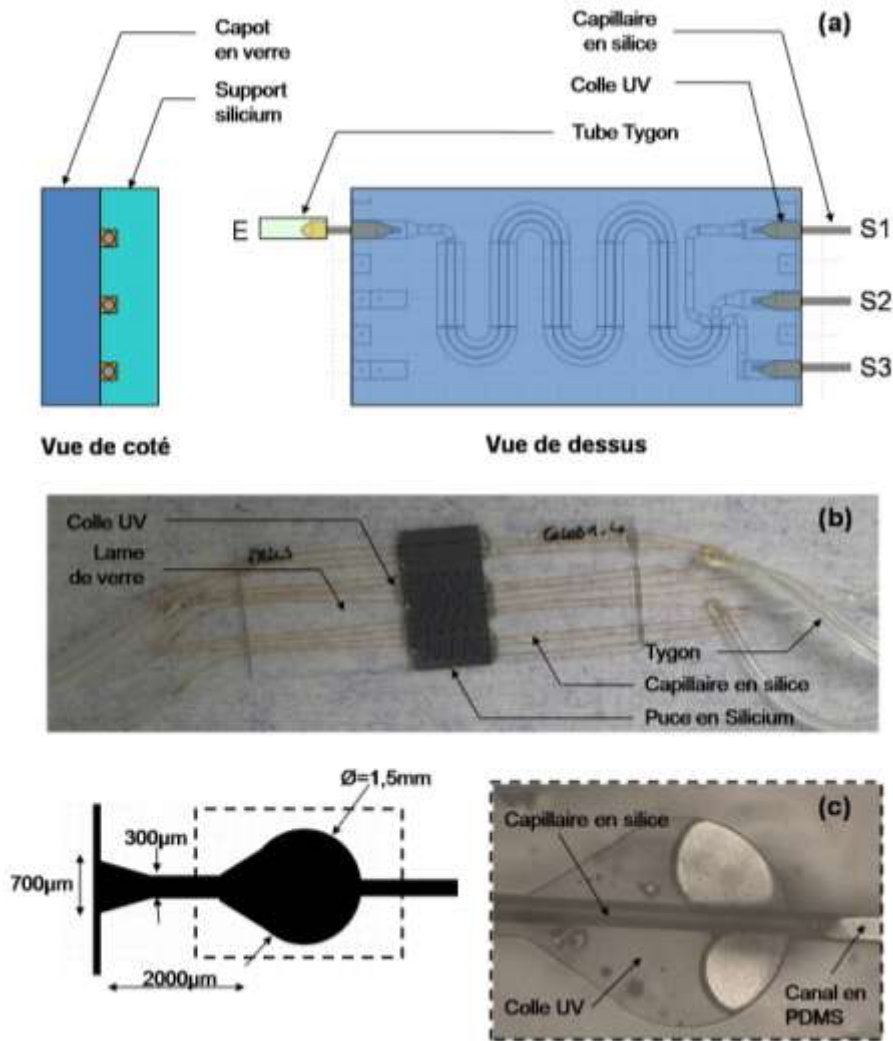


Figure IV.4 : (a) Schéma d'une puce en silicium packagée. Vue de côté et vue de dessus. E est l'entrée du dispositif à laquelle est connecté un tube en Tygon pour permettre l'injection de l'échantillon. S1, S2 et S3 constituent les trois sorties de cette puce. (b) Photographie du packaging d'une puce en silicium contenant 6 motifs. (c) Packaging d'une puce en PDMS et insertion du capillaire dans la tranche, à l'aide d'une entrée de canal en forme de cloche.

Il faut noter ici que, pour les dispositifs en PDMS, nous avons tout d'abord essayé une connectique classique [TAB 03] par insertion d'un capillaire par le dessus, à l'aide d'un cylindre percé dans le PDMS avant l'étape de scellement. L'élasticité du PDMS permet d'assurer l'étanchéité mais ce type de connectique n'a pas tenu longtemps à nos débits. C'est pourquoi nous sommes passés à une connectique par la tranche, avec un mode

opératoire similaire à celui utilisé sur nos puces en silicium. Afin d'en renforcer la tenue en pression, une entrée en forme de cloche permet d'avoir un bouchon de colle, comme illustré Figure IV.4.c.

B.3. Contrôle de l'injection

Comme expliqué précédemment dans le Chapitre 3, il existe différentes façons de déplacer un fluide dans un canal. Le travail présenté ici a essentiellement été mené grâce à un contrôle en débit, à l'aide d'un pousse-seringues (KdScientific). Le pousse-seringues impose un débit volumique donné grâce à l'ajustement approprié de la force appliquée sur la seringue. Les seringues sont en plastique (Terumo) d'un volume de 1, 5 ou 10mL selon les débits utilisés qui, au cours de ce travail, varient de 10nL/min à 500 μ L/min.

Un contrôle en pression (Fluigent) aurait pu être envisagé. L'intérêt majeur de cette méthode est la réponse rapide de l'écoulement (quelques secondes), par opposition au contrôle en débit où il est nécessaire d'attendre l'établissement complet de l'écoulement et sa stabilisation (quelques minutes) [TAB 03]. Le choix du pousse-seringues se justifie par plusieurs raisons : tout d'abord il permet de caractériser nos dispositifs du point de vue des débits, ce qui est indispensable pour comparer les résultats. Pour cette raison, l'injection par contrôle en pression aurait nécessité un capteur supplémentaire pour la mesure de cette grandeur, et consommable à cause du sang. Enfin, la régulation par pertes de charge est fonction de la viscosité de l'échantillon qui, dans les cas considérés ici, varie d'un donneur à l'autre et lorsqu'on modifie la dilution de l'échantillon injecté. Ainsi le pousse-seringues s'avère plus pratique pour les expériences préliminaires de caractérisation présentées ici. Une fois la géométrie du dispositif stabilisée, le contrôle en pression sera tout de même envisagé dans la Partie 5 car il possède des avantages dont nous discuterons.

Le banc expérimental complet est représenté sur la Figure IV.5. On y observe le pousse-seringues relié au microsystème considéré ; l'ensemble est placé sur la plateforme d'un microscope classique (Axioplan), relié à une caméra (Olympus) pour les enregistrements.

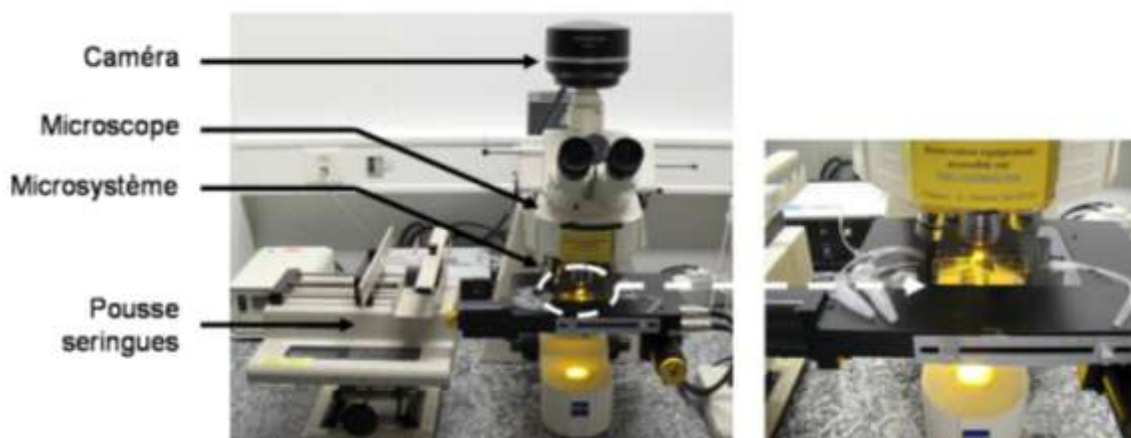


Figure IV.5 : Photographie du banc expérimental.

C. Méthodes de caractérisation

C.1. Caractérisation optique

C.1.1. Visualisation au microscope

Selon les expériences, la visualisation se fait avec une loupe binoculaire (Stéréo Lumar V12, Zeiss) ou avec un microscope en réflexion (Axioplan2 Imaging, Zeiss) lorsqu'une précision supérieure est requise, en particulier pour l'observation des cellules. Suivant les éléments observés, différents modes d'observation seront utilisés préférentiellement [PER 94]. La Figure IV.6 en présente quelques exemples.

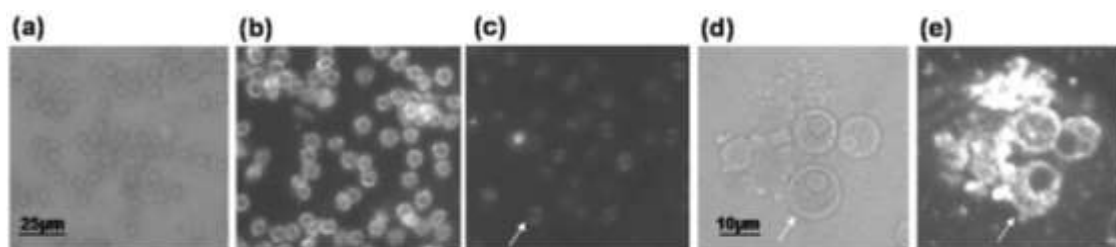


Figure IV.6 : Analyse des différentes méthodes de visualisation de cellules sanguines au microscope et modes d'observation. La 1^{ère} barre d'échelle est commune aux photos a, b et c, la 2nde aux photos c et d. (a, b) GR observés en fond clair et en fond noir. (c) GR lysés observés en fond noir. On peut distinguer la membrane du GR. (d, e) GB observés en fond clair et en fond noir.

✓ La microscopie à fond clair : elle permet, dans le spectre du visible, d'observer facilement les GR dont l'intérieur est contrasté par rapport à l'extérieur grâce à l'hémoglobine (Figure IV.6.a). En revanche, les GB et les PLT sont plus difficiles à visualiser du fait de leur faible contraste (Figure IV.6.d). C'est la limite principale de cette technique.

✓ La microscopie à fond noir : elle s'utilise pour l'observation de cellules dont les structures (membrane, noyau) présentent d'importantes variations d'indice de réfraction peu ou pas visibles en fond clair à cause d'un faible contraste. On peut ainsi visualiser les PLT, le cytoplasme et le noyau foncé des GB (Figure IV.6.e), et même la membrane d'un GR lysé difficilement visualisable en fond clair (Figure IV.6.b et c). Cependant, pour ces mêmes raisons, la moindre impureté présente dans l'échantillon est également fortement réfringente et empêche toute observation quantitative.

✓ La microscopie à fluorescence : c'est une technique d'observation très sensible et indispensable ici pour la détection des cellules les moins concentrées, comme les GB noyés dans la masse de GR, ou les plus petites, comme les PLT.

C.1.2. Vidéo et analyse

Toutes les expériences sont enregistrées ou photographiées avec une caméra DP71 (Olympus). Les acquisitions sont faites avec le logiciel Cell^A (Soft Imaging System) et les images sont traitées avec ImageJ.

Dans la plupart des expériences réalisées en flux, les particules considérées transitent rapidement dans les régions de visualisation. Le mode d'observation choisi permet principalement de visualiser les effets collectifs, c'est-à-dire les grandes tendances de l'écoulement (plasma et flux de GR), et éventuellement les trajectoires des billes fluorescentes. Pour visualiser chaque particule, l'idéal aurait été d'avoir un système d'observation plus puissant et plus rapide.

C.2. Caractérisation biologique

Dans la perspective de la validation biologique d'un microsystème de fractionnement sanguin, il est nécessaire de développer quelques tests élémentaires de caractérisation, applicables aussi bien à l'extraction témoin qu'au dispositif d'extraction proposé. Pour cela, une partie importante de ce travail de thèse a été de mettre en place des tests simples et rapides permettant cette première validation biologique.

C.2.1. Caractérisation de la composition cellulaire

La première caractérisation biologique consiste en la qualification cellulaire de tout échantillon injecté ou extrait, c'est-à-dire la détermination de sa composition. Il fut ainsi nécessaire de mettre au point un marquage spécifique de chaque type cellulaire, afin de le visualiser si possible pendant l'écoulement et après l'injection (dans les différents tubes d'extraction considérés) et de le compter.

Marquage spécifique en fluorescence

Comme expliqué précédemment, les GR sont tout à fait visibles en lumière blanche et fond clair, du fait de leur contenu en hémoglobine. Il n'est donc généralement pas nécessaire de les marquer en fluorescence.

Ce n'est pas le cas des PLT et GB qui sont respectivement trop petites et trop peu nombreux pour être discernables dans la masse de GR. Toute visualisation nécessite donc un marquage spécifique en fluorescence. Pour cela, la méthode la plus simple, envisagée ici, est le marquage par interaction Ac/Ag : le fluorophore (FITC) de détection est placé sur un anticorps ciblant la cellule à marquer. Les anticorps monoclonaux utilisés sont les anti-CD61 et anti-CD45 (BD) respectivement pour marquer les PLT et les GB, que l'on nommera par la suite CD61 et CD45 par souci de simplification. Les conditions expérimentales utilisées pour ces marquages sont similaires : 4 μ L d'Ac + 20 μ L de sang, incubation 15min dans l'obscurité et à température ambiante puis observation.

✓ Le marquage au CD61 donne un rapport Signal / Bruit qui permet de très bien discerner les PLT en régime statique. Il est en revanche impossible de les visualiser en flux à nos débits (100 μ L/min par exemple).

✓ La détection des GB dans un échantillon de sang complet injecté en microsystème est quant à elle un véritable défi, encore d'actualité comme le rappellent Zheng et col. dans [ZHE 08]. Cette visualisation nécessite un taux de dilution élevé pour empêcher

l'interférence due à la surconcentration des GR alors même que, pourtant, la dilution est une contrainte ; elle augmente le volume d'échantillon à traiter ainsi que le risque d'être en dessous de la limite de détection.

Ici, le marquage au CD45 donne un rapport Signal / Bruit trop faible car les GB sont noyés dans la masse des GR mais surtout parce que le marquage du GB se limite à ses membranes (antigènes membranaires). Une autre possibilité intéressante est l'utilisation d'un intercalant de l'ADN qui va marquer les noyaux (Syto9, Kit BacLight, Invitrogen). Les conditions expérimentales utilisées pour ce marquage sont les suivantes : 0,2µL de Syto9 à 3,34mM + 20µL de sang, incubation 15min dans l'obscurité et à température ambiante puis observation. Ce marquage donne un signal beaucoup plus fort que le marquage membranaire et rend possible une visualisation nette des GB dans un échantillon, même de sang complet. Il faut cependant noter quelques inconvénients. Tout d'abord le Syto9, en tant qu'intercalant de l'ADN, est un produit cancérigène ; il est donc à utiliser avec parcimonie et précaution. Par ailleurs, en tant que marqueur des noyaux, il rend difficile le distinguo entre deux lymphocytes placés côte à côte et un polynucléaire constitué de deux lobes. Finalement, malgré la nette amélioration dans l'intensité du signal obtenu, il reste toujours difficile de visualiser les GB en flux rapide (c'est-à-dire > 10µL/min).

Pour résumer, l'observation en flux des PLT et des GB a été un point critique tout au long de ce travail. Ce problème limitant n'a d'ailleurs pas vraiment été résolu dans le temps imparti. La solution retenue à court terme est le comptage comparé des échantillons injectés et extraits a posteriori, c'est-à-dire le comptage en lame une fois l'injection fluïdique terminée.

Comptage des cellules en lame de comptage

Les GR peuvent se compter directement en cellules de comptage traditionnelles, comme les lames Quickread (lames jetables en plastique). En conclusion, les GR se comptent facilement, de façon fiable et sans nécessiter d'étape supplémentaire de marquage.

Pour le comptage des PLT contenues dans un échantillon, le phénomène d'agrégation plaquettaire, très important au bout de deux jours de stockage des échantillons au réfrigérateur, rend difficile tout comptage fiable des PLT. En effet un biais apparaît lors de la dilution d'un même échantillon et empêche de remonter à la concentration réelle de l'échantillon. Mais ce biais, reproductible, permet toutefois d'obtenir un ratio fiable entre deux échantillons (données non montrées). Cette hypothèse a été validée par l'obtention d'un comptage cohérent et reproductible sur des échantillons sanguins prélevés dans la journée et traités pour limiter l'agrégation naturelle des PLT. En conclusion, il est facile de marquer les PLT et de les visualiser dans un échantillon statique donné. Il nous est en revanche plus difficile de les compter de façon fiable dans nos conditions de prélèvement sanguin.

Grâce à l'amélioration du signal apportée par l'usage du Syto9, il est devenu possible de compter les GB de façon fiable en cellule Quickread, c'est-à-dire que la concentration estimée est proportionnelle à la dilution de l'échantillon sanguin (données non fournies). En conclusion, il est possible de marquer les GB, de les visualiser dans un échantillon donné et de les compter, avec un intercalant ou bien avec un marquage Ac/Ag, qui sera moins efficace mais plus simple de mise en œuvre.

Comptage des cellules par cytométrie en flux

Afin de pallier ces difficultés de comptage, une nouvelle solution de caractérisation de la composition cellulaire a été mise en place, fondée sur la cytométrie en flux, dont le principe est expliqué dans la Figure IV.7.a.

Cette technologie permet la mesure simultanée des différentes caractéristiques d'une cellule, comme sa taille relative, sa granularité relative et son intensité de fluorescence relative, le type cellulaire ciblé étant marqué au préalable de façon spécifique [BD 02]. Dans ce but, un module fluïdique aligne tout d'abord les cellules de l'échantillon par focalisation hydrodynamique, à l'aide d'un liquide de gainage. Cette focalisation permet aux cellules de défiler en flux continu une par une dans une chambre d'analyse, à une vitesse de 500 à 4000 cellules par seconde. Un module optique, constitué d'une source d'excitation (un rayon laser focalisé) et d'un dispositif optique de réception peut alors détecter la cellule et analyser sa capacité à diffracter la lumière incidente et à émettre une fluorescence. Enfin, un module électronique convertit ces signaux optiques afin de permettre le traitement des données.

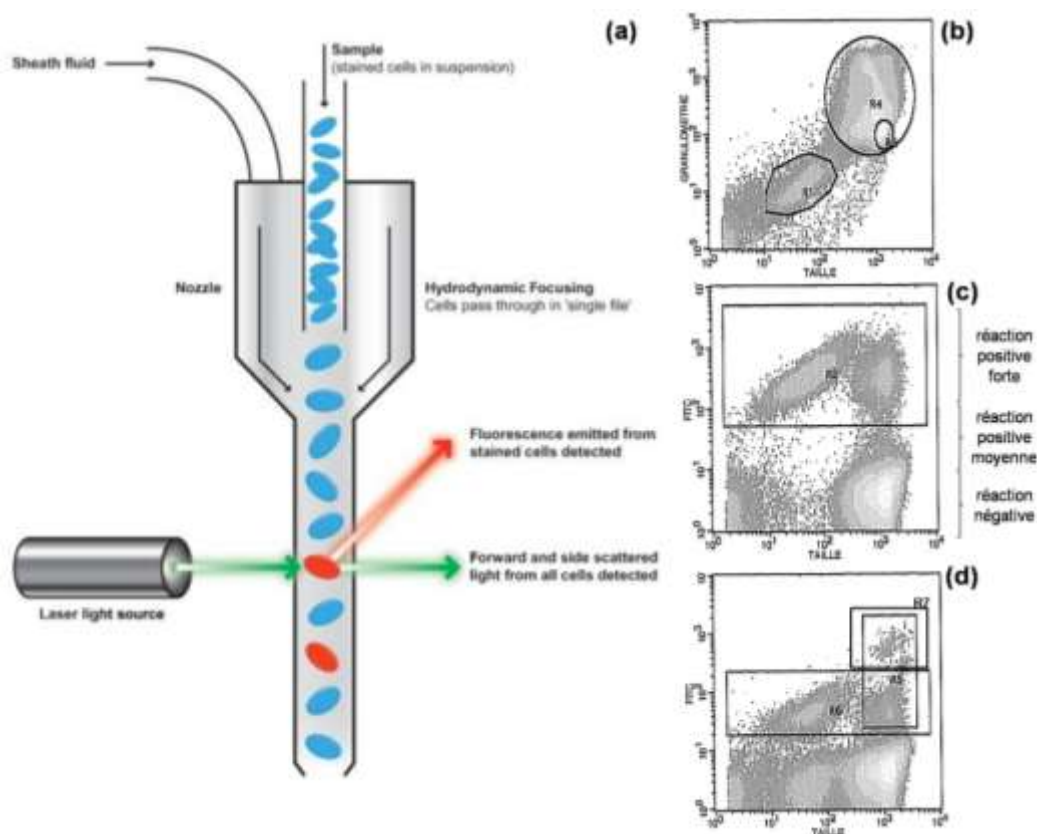


Figure IV.7 : Étude de la composition cellulaire d'un échantillon par cytométrie en flux. (a) Schéma de principe. (b, c, d) Résultats obtenus avec le FACSCalibur de BD pour un échantillon sanguin. (b) Granulométrie en fonction de la taille. (c) Intensité de fluorescence obtenue après marquage des PLT. (d) Intensité de fluorescence obtenue après marquage des GB.

Deux sortes de visualisations graphiques différentes sont utilisées. Tout d'abord, la Figure IV.7.b représente la granulométrie en fonction de la taille. Cette représentation donne pour les cellules sanguines R1=PLT et R4=GR+GB. La Figure IV.7.c quant à elle représente l'intensité de fluorescence (ici FITC) en fonction de la taille. L'efficacité du marquage peut être définie de la façon suivante : de 10^0 à 10^1 , la réaction est

considérée comme négative, de 10^1 à 10^2 , moyenne et de 10^2 à 10^3 , forte. Ces représentations sont globales, chaque point correspondant à une cellule. Une bonne interprétation nécessite l'étude simultanée de ces deux graphiques. Il est ensuite possible de définir des régions d'intérêt sur lesquelles les cellules sont comptées relativement au nombre total de cellules qui sont passées devant le détecteur.

Les Figure IV.7.b, c et d représentent les résultats obtenus pour des échantillons de sang analysés à l'aide d'un cytomètre BD FACSCalibur (BD Biosciences). La Figure IV.7.c représente la répartition en fluorescence obtenue après un marquage plaquettaire. La région d'intérêt R2 semble contenir 31.624 PLT (sur 500.000 cellules passées) alors que la valeur attendue par la numération de l'EFS est de 30.150. Ces deux valeurs sont cohérentes. Notons que la répartition en taille obtenue illustre que beaucoup de PLT sont agrégées. De même, la Figure IV.7.d représente la répartition en fluorescence obtenue après un marquage leucocytaire. La région d'intérêt R7 contient 502 GB pour 500.000 cellules passées alors que la valeur attendue par la numération de l'EFS est de 784. Ces valeurs sont comprises dans les mêmes ordres de grandeur. Ces résultats seraient probablement plus proches si cette analyse était réalisée sur un sang plus récent.

Cette technique permet donc d'obtenir la proportion d'un type cellulaire donné par rapport au nombre total de cellules présentes dans l'échantillon.

Calcul de la pureté cellulaire

La pureté de l'échantillon extrait se définit par sa contamination C^* exprimée en %. C^* représente la concentration en un type cellulaire donné (généralement en GR) mesurée dans l'échantillon extrait (C_E) par rapport à la concentration initiale de l'échantillon injecté (C_I).

$$C^* = \frac{C_E}{C_I} \quad (\text{IV-1})$$

Ces concentrations sont obtenues par un comptage en cellules de comptage (Quick Read, Globe Scientific INC). Donc plus la contamination C^* est faible, meilleure est la pureté d'extraction de notre dispositif par rapport à ce type cellulaire.

C.2.2. Caractérisation de l'hémolyse

L'hémolyse correspond à la lyse des GR et entraîne un relargage massif d'hémoglobine en solution. Cette protéine est un contaminant pour beaucoup d'analyses. Il est donc nécessaire de mettre en évidence cette contamination et de la quantifier précisément.

Dans ce but, un pourcentage de lyse est déterminé en utilisant pour référence un échantillon de sang total lysé. Ce témoin est obtenu à l'aide du tampon de lyse Roche (Red Blood Cells Lysis buffer) qui, tout en préservant les GB, lyse tous les GR et relargue dans la solution l'hémoglobine qui y est contenue. Le protocole est le suivant : dilution au 1/3 de l'échantillon de sang dans le tampon, incubation 10min et centrifugation 5min à 2500tr/min pour culotter les GB. Ce témoin correspond donc à 33% d'hémolyse. Les lysats suivants sont obtenus par dilutions successives de ce témoin avec du tampon PBS.

Dosage visuel pour une estimation grossière

Dans un premier lieu, il est possible d'estimer visuellement ce pourcentage d'hémolyse (Figure IV.8) de façon relativement sensible. En effet, il suffit de 0,5 % de GR lysés pour que la coloration rouge caractéristique apparaisse. En dessous de 0,4%, il devient difficile d'estimer une lyse d'autant que le plasma est naturellement coloré. Au dessus de 1,5% de GR lysés, la coloration rouge est évidente. A partir de 3%, l'œil ne discerne plus de nuances dans les rouges obtenus.

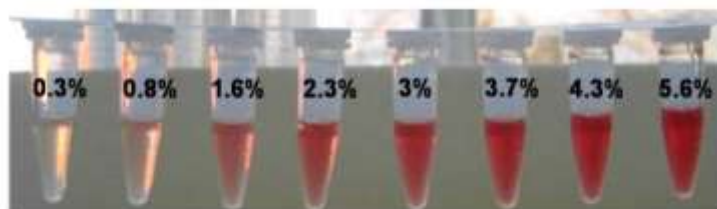


Figure IV.8 : Gamme d'hémolyse, de 0.3% à 5.6%.

Dosage quantitatif par la méthode de Cripps

Afin d'évaluer de façon plus précise le taux d'hémolyse produit, la concentration en hémoglobine relarguée dans l'échantillon par les GR lysés est mesurée à l'aide de la méthode de Cripps [CRI 68], comme expliqué par VanDeLinder et al. [VAN 06]. Cette méthode permet de soustraire au signal principal l'absorption de l'hémoglobine de celle des autres protéines (bruit), en particulier la bilirubine (Figure IV.9.a). L'absorption de l'échantillon est mesurée à 576nm (où le pic d'absorption de l'oxyhémoglobine est maximal) puis à 560 et 592nm. La bilirubine est prise en compte par une correction mathématique qui considère son spectre comme étant rectiligne dans l'intervalle de longueurs d'ondes considérées. La concentration en hémoglobine de l'échantillon est proportionnelle à la somme des absorbances suivantes (Equation IV-2), communément appelée somme de Cripps :

$$2A(576nm) - A(560nm) - A(592nm) = K_1 \cdot [Hb] = K_2 \%_{Lyse} \quad (IV-2)$$

où $[Hb]$ est la concentration en hémoglobine (en mg/mL), $\%_{Lyse}$ le pourcentage de lyse estimé, K_1 et K_2 des constantes de proportionnalité.

A partir de cette méthode, il est alors possible de tracer une courbe étalon, correspondant à la somme de Cripps en fonction du taux d'hémolyse pour des échantillons connus. Comme illustré sur la Figure IV.9.b, la somme de Cripps augmente avec le taux d'hémolyse de l'échantillon puis, à partir d'un taux d'hémolyse de 1%, diminue jusqu'à devenir nulle. En fait chaque absorbance sature après 1% d'hémolyse, donnant une somme de Cripps qui tend vers 0. Mais de 0 à 1% d'hémolyse, comme représenté dans l'insert de cette même Figure IV.9.b, la somme de Cripps augmente bien linéairement avec le taux d'hémolyse ($R^2=0,99$). Cet étalonnage permet donc d'estimer le pourcentage de lyse de tout échantillon qui serait faiblement lysé, avec un $\%_{Lyse}$ compris entre 0 et 1%.

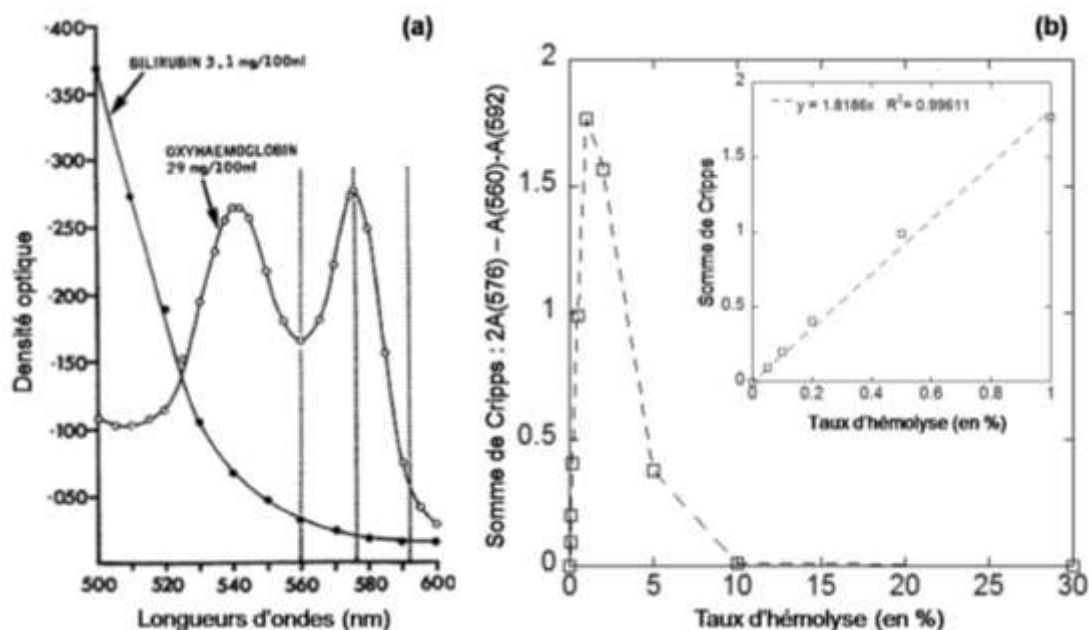


Figure IV.9 : Estimation du pourcentage d'hémolyse par dosage de l'hémoglobine relarguée. (a) Spectre d'absorption de la bilirubine et de l'oxyhémoglobine, extrait de [CRI 68]. (b) Courbe d'étalonnage obtenue à partir d'échantillons à taux d'hémolyse connus.

C.2.3. Caractérisation de l'adsorption des protéines

Dosage global

Une première validation du plasma consiste à doser l'ensemble des protéines présentes dans l'échantillon, sans distinction de leur nature. Ce dosage se fait classiquement par une mesure d'absorbance à 280nm. En effet, les protéines présentent un pic d'absorbance à cette longueur d'onde, du fait de l'absorption de la lumière par les acides aminés aromatiques (Tyr, Phe, Trp). On applique alors la loi de Beer-Lambert dans l'ultraviolet (Equation IV-3),

$$A(280nm) = \varepsilon_{280} \cdot l \cdot [prot] \quad (IV-3)$$

avec, pour un échantillon protéique donné, ε_{280} l'absorptivité molaire ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$), l la longueur du chemin optique (cm), $A(280nm)$ l'absorbance mesurée au spectrophotomètre (Cary300, Varian) et $[prot]$ la concentration estimée (g/L).

L'albumine est la protéine prédominante d'un plasma sain, puisqu'elle représente 60% de la quantité totale de protéines plasmatiques. Le calcul de la concentration en albumine dans l'échantillon peut donc être considéré comme une estimation grossière mais simple et rapide de la concentration totale en protéines. On utilise pour ce calcul la constante d'absorptivité de l'albumine $\varepsilon_{280}(\text{albumine}) = 4,6 \cdot 10^4 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ainsi que $l=1cm$ et $M(\text{albumine})=66430g/mol$. Par exemple, pour le dosage d'un plasma dilué 1:20 (soit un taux de dilution de 5%) qui donne une absorbance de 1,6, cela correspond après calculs à une concentration en protéines de 2,3g/L, soit de 46g/L en tenant compte de la dilution. Cette valeur est cohérente avec les 50g/L attendus.

Une fois cette méthode définie, il est nécessaire d'évaluer la gamme de dilutions du plasma pour lesquelles l'absorbance mesurée est linéaire et bien proportionnelle à la concentration réelle. Pour cela, la Figure IV.10 représente l'absorbance mesurée en fonction du taux de dilution de l'échantillon. Ce graphe montre que l'absorbance augmente avec la concentration de l'échantillon puis sature à 2,3 aux alentours d'une dilution de 10%. Un zoom réalisé aux concentrations les plus faibles (voir l'insert placé dans cette figure) permet de confirmer que l'absorbance évolue linéairement avec le taux de dilution pour des dilutions de 0 à 5% (1:20). Il sera donc nécessaire, pour utiliser cette méthode de dosage, de travailler avec du plasma provenant d'un sang dilué au moins 1:20. Pour un échantillon plus concentré, la saturation du système de mesure donnera des résultats peu fiables.

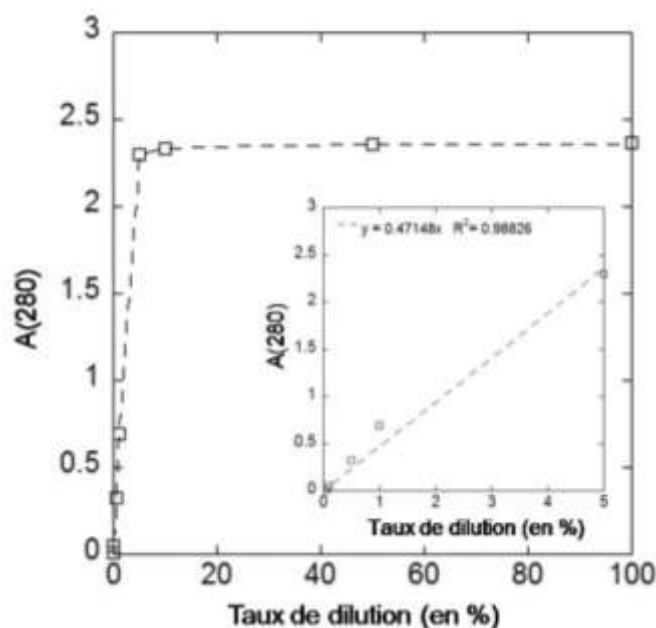


Figure IV.10 : Estimation de la concentration protéique par dosage global à 280nm et courbe d'étalonnage obtenue à partir de dilutions d'un échantillon de concentration connue. Pour indications, 100%=aucune dilution, 50%=dilution 1:2, 5%=dilution 1:20.

Dosage des protéines majoritaires

Une analyse par électrophorèse capillaire (BioAnalyser Proteins, Agilent) permet d'identifier et de doser certaines protéines majoritaires de l'échantillon de plasma. C'est l'étape idéale après un test préliminaire de dosage global, afin d'avoir des données quantitatives plus spécifiques.

Les protéines migrent dans un gel en fonction de leur rapport taille/charge. Ici, la puce utilisée permet de détecter des protéines jusqu'à un poids moléculaire de 80kDa. Le profil détaillé des protéines plasmatiques a été cartographié sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE par Anderson et al [AND 77]. Le protocole utilisé est celui conseillé par Agilent [AGI 03] en conditions réductrices.

Avant toute expérience de validation, il a été nécessaire de trouver la dilution du plasma la mieux adaptée. La Figure IV.11.a représente les électrophorégrammes obtenus pour

différentes dilutions de plasma, sous forme de pseudo-gels. Une bande représente une protéine. Plus une bande est marquée, plus la protéine est concentrée dans l'échantillon. Lorsque l'échantillon est trop concentré (puits 2 et 3), les bandes obtenues se chevauchent entre elles ainsi qu'avec les bandes systèmes (en pointillés larges, issues du système de calibration de l'appareil). Il n'est pas possible d'interpréter les gels obtenus. Lorsque l'échantillon est trop dilué (puits 7 et 8), les pics d'intérêt sont difficilement discernables. Une dilution de l'ordre du 1:10 permet d'obtenir des résultats facilement exploitables, tels que l'électrophorégramme de la Figure IV.11.b. On y retrouve entre autre l'albumine (n°11, >50kDa), les chaînes légères des immunoglobulines (n°7, 23kDa) et l'hémoglobine (n°5 et 6, autour de 15kDa) tandis que les pics n°2, 4 et 14 correspondent aux pics système. Il est alors possible de superposer des électrophorégrammes pour comparer la composition d'un plasma donné à celle d'un plasma témoin. C'est donc l'intervalle de dilutions [1:10 - 1:25] qui a été retenu pour la suite.

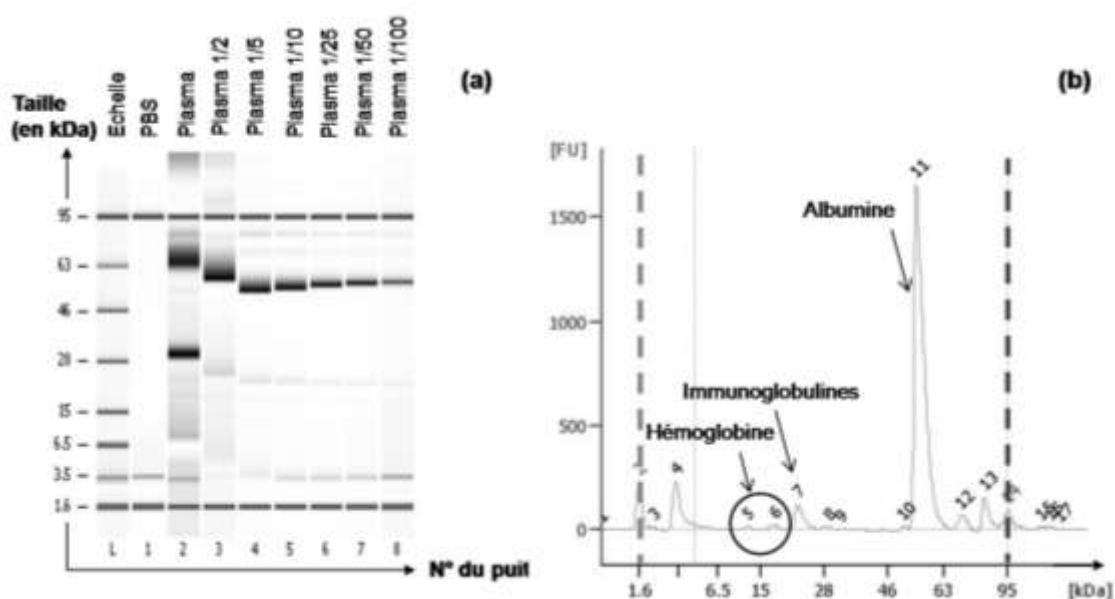


Figure IV.11 : Dosage des protéines majoritaires du plasma par le kit Agilent Proteins 80. (a) Gel d'électrophorèse obtenu pour différentes dilutions du plasma. (b) Electrophorégramme correspondant au plasma 1:10.

C.2.4. Caractérisation de la dénaturation des protéines

Les protéines, même si elles sont présentes, peuvent être dénaturées. Pour en vérifier l'intégrité, l'activité de deux enzymes plasmatiques, les Aminotransférases Alanine (ALT) et Aspartate (AST), est dosée à l'aide d'un système Cholestech (LDX Systems) et des cassettes microfluidiques correspondantes (ALT-AST test cassettes) selon le protocole du fabricant [CHO 04].

Pour les deux transaminases considérées, la mesure de l'activité enzymatique se fait de manière analogue, par l'utilisation de réactions enzymatiques en cascade (Figure IV.12) dont la dernière étape consiste en une réaction colorimétrique. La couleur finale du milieu réactionnel est d'un bleu proportionnel aux produits des réactions d'ALT et AST, traduisant ainsi directement leur activité enzymatique. L'activité d'ALT et/ou AST peut

donc être mesurée de façon quantitative par photométrie. Le système Cholestech traduit alors cette mesure d'intensité en activité U/L, à l'aide d'un étalonnage interne à la machine.

Les gammes d'activités enzymatiques dites normales varient de 7 à 40 U/L pour l'ALT et de 13 à 40 U/L pour l'AST [CHO 07]. En cas de pathologies du foie par exemple, ces valeurs peuvent être 1000 fois supérieures. Cependant, la gamme de valeurs détectées par le Cholestech reste limitée à l'intervalle 10 - 400 U/L.

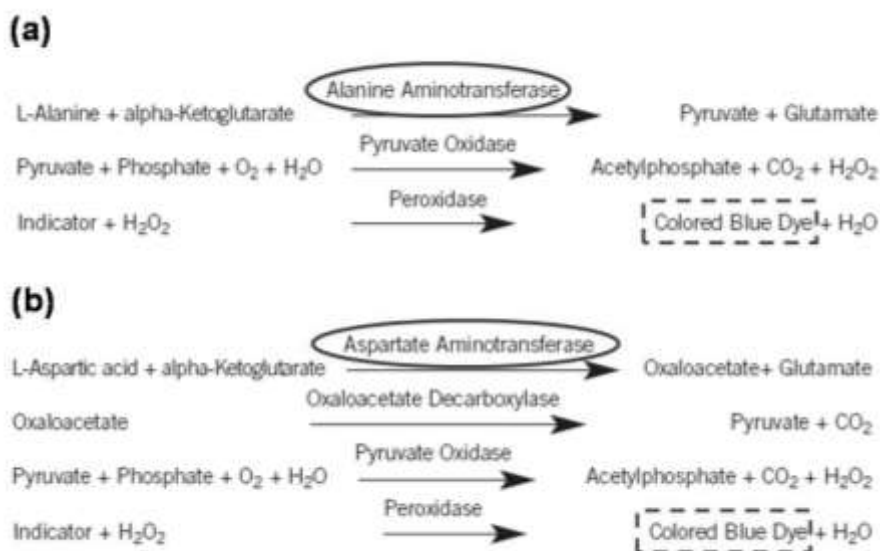


Figure IV.12 : Dosage de l'activité enzymatique des transaminases AST et ALT. L'enzyme ciblée est entourée d'un ovale en traits pleins tandis que le produit donnant sa couleur au milieu réactionnel est entouré d'un rectangle en pointillés. D'après la notice Cholestech LDX ALT-AST, disponible sur www.cholesteck.com.

Les échantillons sanguins utilisés ici étant toujours issus de donneurs sains (de provenance EFS), leur concentration en transaminases est proche de la limite inférieure de détection dès le début de l'expérience. Une fois dilués avant l'injection en microfluidique, la limite de détection est donc largement dépassée. Afin d'être dans la bonne gamme de détection, une solution est d'enrichir le sang en transaminases porcines (Sigma), et ainsi de simuler des cas pathologiques, avant dilution de l'échantillon et injection en microsystème.

V. Evaluation de quelques techniques de microfluidique passive

Cette première série d'expériences a été menée à l'aide d'une série de puces en silicium (le lot FRICS) fabriquées au début de ce travail de thèse dans un but exploratoire, afin de tester certains principes fluidiques connus qui paraissaient intéressants au vu de l'étude bibliographique préliminaire conduite au Chapitre 3. Il s'agissait tout d'abord de comprendre les avantages et les inconvénients de chaque technique.

Ces expériences ont permis de se familiariser avec la manipulation d'échantillons sanguins et de mettre en place un banc expérimental défini dans le Chapitre 4, mais également de faire germer et mûrir les techniques innovantes qui seront abordées dans les Chapitres 6 et 7.

Ce chapitre apparaîtra donc comme une visite guidée à travers ces phénomènes fluidiques sans avoir pour souci d'accumuler des résultats quantitatifs ou de mener chacune de ces techniques au bout.

A. Banc expérimental

Les conditions expérimentales utilisées au cours de ce chapitre sont les mêmes pour tous les principes fluidiques testés. Les puces utilisées ont été fabriquées selon la technologie Silicium, comme détaillé dans le Chapitre 4, avec deux profondeurs de gravure : les canaux principaux sont profonds de 200 μ m tandis que les motifs filtrants sont de profondeur variable (0,5, 1,5 ou 10 μ m). Chaque principe fluidique a été testé tout d'abord avec des billes fluorescentes suspendues dans du PBS (3, 5 ou 10 μ m de diamètre) puis avec du sang dilué de cochon.

L'ensemble des puces de ce chapitre sont utilisées avec un pousse-seringues afin de contrôler l'écoulement par les seules pertes de charges des dispositifs considérés. Le rendement d'extraction η est défini dans l'équation (V-1) comme étant le volume de fraction liquide extrait (V_E) sur le volume total de suspension injecté (V_I).

$$\eta = \frac{V_E}{V_I} \quad (\text{V-1})$$

Aucun marquage spécifique des cellules sanguines n'a été utilisé dans ce chapitre, car les anticorps fluorescents disponibles dans le commerce ne ciblent pas les cellules de cochon.

B. La filtration

B.1. Puces Filtres

B.1.1. Principe

La séparation par filtration utilise la différence de taille entre les différents types cellulaires. Le principe consiste alors en une ségrégation à l'aide de pores bien dimensionnés. En effet, les GR sont épais de $2\mu\text{m}$ tandis que les GB sont larges de $5\mu\text{m}$.

Les publications utilisant ce principe sont très nombreuses [CHE 09, JI 06, SET 06.2, VAN 06, CRO 05, JI 08, CHE 08] car la microfiltration est une technique simple à mettre en place. Cependant son efficacité est contestable car les risques de colmatage sont très élevés et fréquents, dus à la déformabilité des globules et leur nombre. Lorsqu'ils sont à l'entrée du pore, les GR se déforment pour tenter de franchir celui-ci. Trois comportements sont observés : (i) les GR peuvent traverser le pore ou (ii) y rester bloqués et s'amonceler progressivement pour former un agglomérat ou encore (iii) lyser sous l'importance de la pression exercée. C'est pourquoi dans la plupart des publications, le système peut être efficace mais durant un laps de temps bien défini (le temps de saturation), pour un volume donné, et généralement pour des échantillons très dilués injectés à des faibles débits [CHE 09]. Comme expliqué dans le Chapitre 3, différentes catégories de microfiltres existent, variant en termes de taille critique de ségrégation, de capacité volumique (c'est-à-dire le volume d'échantillon injecté avant colmatage) et d'efficacité de filtration ou de rétention. On en rappelle ici les résultats importants : Ji et col. ont comparé les différents filtres existants dans [JI 06] et ont montré que la filtration transverse était nettement la plus intéressante, avec un piégeage de GB plus efficace (70-95%) qu'une filtration standard directe, pour un débit de $20\mu\text{L}/\text{min}$, et pour un procédé de fabrication plus simple (Figure V.1).

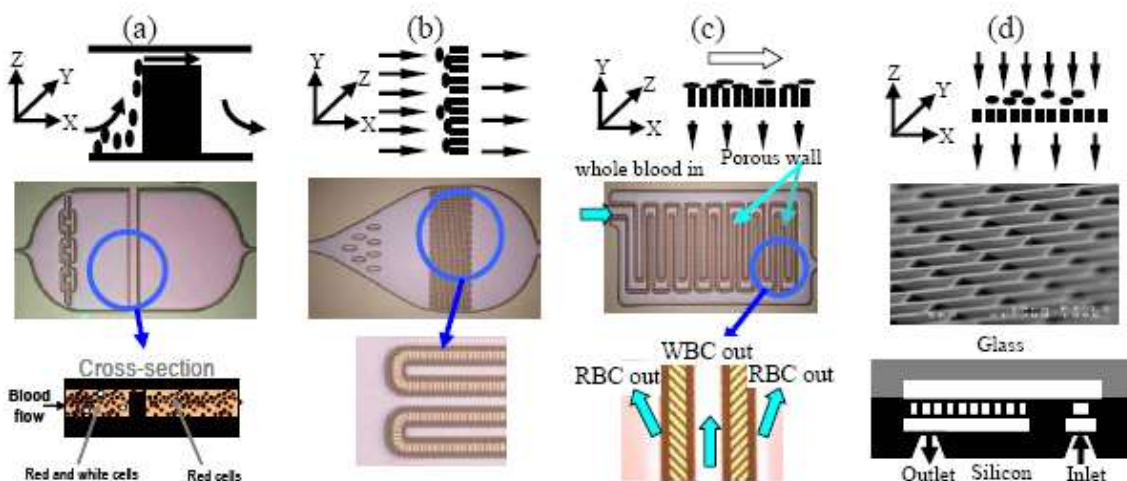


Figure V.1 : Représentation des différents types de filtres utilisés par Ji et col. dans [JI 06]. (a) Le filtre barrage, (b) le filtre à piliers, (c) le filtre à flux transverse et (d) le filtre membrane.

Notre objectif, avec une géométrie très proche de celles qui peuvent être observées dans la littérature, est avant tout de se familiariser avec la filtration et de se sensibiliser aux problèmes cités plus haut. Sachant que contrairement aux meilleurs résultats collectés

dans les publications, notre préoccupation est de se rapprocher le plus possible de la dilution zéro.

B.1.2. Dispositifs

Deux géométries différentes ont été fabriquées afin de tester le principe de filtration transverse :

- les puces *U* (Figure V.2.a et b). Elles constituent un dispositif simple et traditionnel. L'échantillon entre par le canal I_B , parcourt la distance d'échange contenant les pores filtrants, puis ressort du dispositif par le canal O_B . La phase extraite au niveau des pores ressort quant à elle par le canal O_P .
- et les puces *Serpentins* (Figure V.2.c et d). Elles sont fondées sur le même principe mais différent par une géométrie plus originale. La partie filtrante s'étend tout le long du circuit qui serpente sur toute la largeur du motif, afin de maximiser la longueur de filtration. Comme précédemment, l'échantillon entre dans le dispositif par le canal I_B et en ressort par O_B , tandis que la phase ciblée traverse la fente de filtration (telle que visualisée sur la Figure V.2.d) et ressort par le canal O_P .

La Figure V.2.e représente en coupe le procédé de microfabrication utilisé. Les puces ont été gravées avec trois hauteurs de filtres possibles : $0,5\mu\text{m}$, $1,4\mu\text{m}$ et $9,5\mu\text{m}$, toujours avec $200\mu\text{m}$ de profondeur principale. Plusieurs largeurs et longueurs de pores ont également été testées, correspondant à différentes résistances fluidiques.

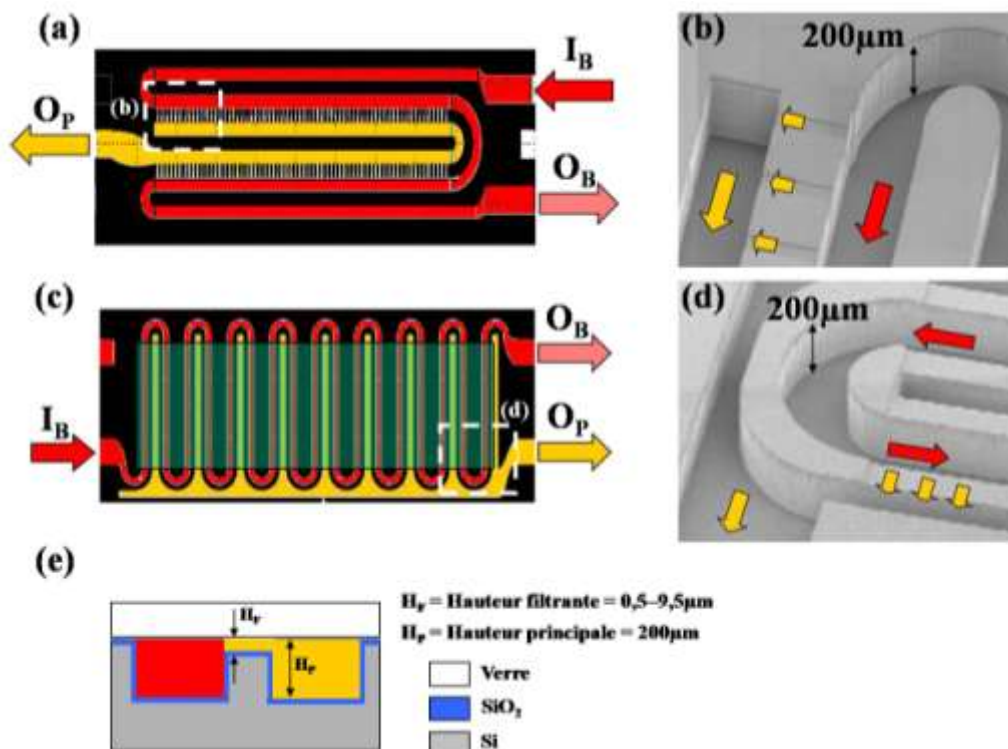


Figure V.2: Description des dispositifs Filtres. (a, c) Schémas de principe des puces *U* et *Serpentin*. (b, d) Photographies MEB des parties filtrantes de chaque puce. Zooms correspondants aux carrés en pointillés sur les schémas de principe. (e) Coupe schématisée de la double gravure des puces Filtres. Une gravure profonde ($200\mu\text{m}$) permet de définir les canaux principaux tandis qu'une gravure superficielle (variant de $0,5$ à $9,5\mu\text{m}$ selon les dispositifs) permet de former les motifs filtrants.

B.1.3. Résultats

✓ Pour les échantillons de billes en suspension : Les dispositifs de filtration peuvent être très efficaces pour extraire la phase liquide d'une suspension de billes de $10\mu\text{m}$. En effet, des taux d'extraction de 0,5 à 1% et de 10 à 25% ont été obtenus respectivement pour des pores de 0,5 et $1,4\mu\text{m}$ dans une puce *U*, tandis que les rendements obtenus pour les puces *Serpentins* sont de 20% à $0,5\mu\text{m}$. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les pores hauts de $9,5\mu\text{m}$ et à un débit de $10\mu\text{L}/\text{min}$: 60% d'extraction pour les puces *Serpentins* et 25% pour les puces *U*. Dans l'ensemble des cas considérés, l'extractant est toujours pur, c'est-à-dire qu'aucune bille n'est observée dans le liquide. La Figure V.3.a représente l'évolution du taux d'extraction de la phase liquide en fonction du temps d'injection et permet d'illustrer les notions de capacité volumique et de temps de saturation. Il apparaît clairement qu'à partir de 30min le rendement chute, et qu'au delà de 50min, le filtre est complètement saturé par le colmatage des pores.

✓ Pour les échantillons sanguins : Avec des échantillons sanguins et des pores de $1,4\mu\text{m}$, ces rendements tombent en dessous de 5%, du fait entre autre d'une concentration en GR trop importante (dilution 1:10) et du colmatage très rapide des filtres (Figure V.3.b). Comme déjà expliqué précédemment, les GR se déforment pour passer au travers des filtres et une grande partie d'entre eux lysent, quelque soit le débit d'injection. Pour les pores de $0,5\mu\text{m}$, aucune filtration n'a lieu car le colmatage est trop rapide. Pour les pores de $9,5\mu\text{m}$, il n'y a pas non plus de filtration car les GR passent facilement au travers des pores qui sont trop grands. Il aurait fallu ici une série de puces supplémentaires, avec une profondeur de filtration intermédiaire, comprise entre 1,4 et $9,5\mu\text{m}$. Une plaque silicium était initialement prévue à $4,5\mu\text{m}$ mais pour des défauts de fabrication elle n'a malheureusement pas pu être utilisée.

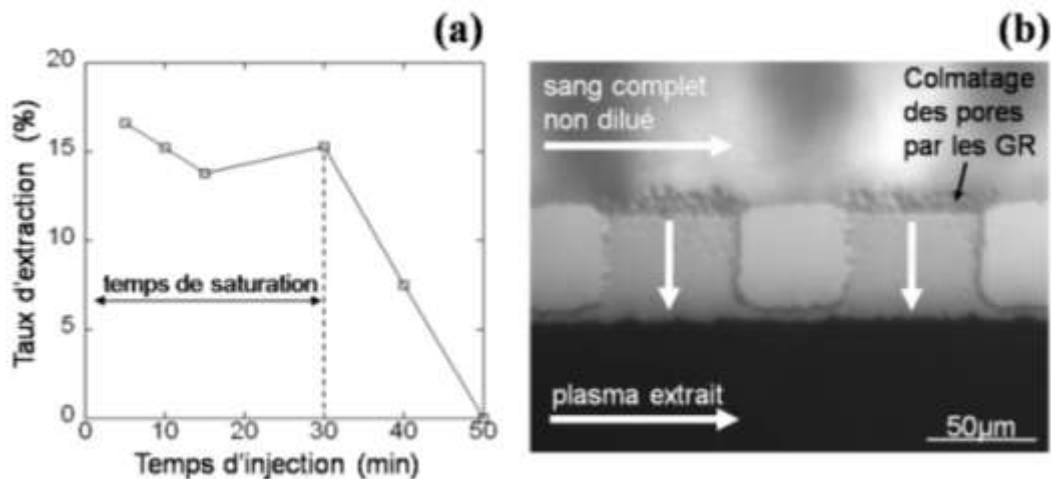


Figure V.3: Résultats obtenus pour la filtration transverse. (a) Taux d'extraction de la phase liquide en fonction du temps d'injection. Une suspension de billes de $10\mu\text{m}$ est injectée dans une puce *U* ayant des pores hauts de $1,4\mu\text{m}$. (b) Illustration des difficultés rencontrées lors d'une injection de sang (dilution 1:10) au niveau des pores $1,4\mu\text{m}$ d'une puce *U*. Les globules colmatent les pores puis se déforment pour essayer de les traverser.

B.1.4. Conclusion

En conclusion la filtration transverse peut être une solution efficace mais pour le tri de billes ou de cellules peu déformables. C'est une solution de durée d'utilisation brève, car limitée par un temps de saturation. Dans le cas du sang, les deux problèmes majeurs sont la déformabilité des GR, qui limite le pouvoir séparateur de la filtration, ainsi que leur fragilité, qui renforce le colmatage, diminue davantage la performance du filtre dans le temps et provoque des problèmes d'hémolyse.

Depuis ce travail, différentes solutions ont été envisagées dans la littérature afin de limiter ces différents problèmes. La première est de réduire au maximum la concentration des cellules en diluant l'échantillon (un facteur de dilution 1:1000 dans [CHE 09]). La seconde est de limiter le débit car un débit faible améliore le rendement [SET 06.3, CHE 09]. La troisième, plus originale, est d'injecter en mode oscillatoire ou en flux transverse une solution tampon pour décrocher les éventuels bouchons colmatant les pores [VAN 07, LI 08]. On peut également citer Shevkoplyas et col. [SHE 06], publication dans laquelle les auteurs rigidifient au préalable les GR pour en modifier la déformabilité. Toutes ces solutions, bien qu'intéressantes et efficaces, ne sont pas compatibles avec notre cahier des charges qui impose une extraction rapide et la moins diluée possible. Enfin, une filtration optimale requiert une fabrication technologique complexe, comme dans [CHE 09], avec une précision de gravure suffisante pour garantir un dimensionnement des filtres au plus près de la taille des cellules à filtrer. Et le risque de lyse est toujours présent.

B.2. Puces Piliers

B.2.1. Principe

Les puces précédentes avaient pour objectif d'expérimenter la filtration dite transverse. Un autre type de filtration fait actuellement l'objet de nombreuses études : la filtration directe par piliers. L'idée est de reproduire en microsystème le principe de certains filtres commerciaux, en retenant entre des piliers serrés une catégorie de particules aux dimensions comparables ou inférieures à l'écart entre les piliers. Par exemple le Leukolock, cité précédemment dans le Chapitre 2, est fondé sur cette idée de filtration saturante et semble très bien fonctionner. Un filtre microstructuré pourrait donner des résultats similaires avec un volume d'échantillon plus faible.

B.2.2. Dispositifs

Différents dispositifs ont été fabriqués afin d'approfondir nos connaissances sur ce phénomène. Comme on l'a vu dans le Chapitre 4, en raison du rapport d'aspect imposé par la gravure RIE, la conception des puces imposait aux piliers un écart minimal de 15 μ m, sachant que les cellules sanguines font entre 2 et 10 μ m. Ces expériences avaient donc pour but essentiel d'évaluer l'effet de ces géométries sur l'écoulement des billes et des GB plutôt que l'étude d'une réelle filtration sanguine. La Figure V.4 présente les différents motifs proposés ainsi que leurs dimensions.

Puce	Description et Dimensions (a)
A	Losanges de 30 μ m – espacés de 30 μ m
B	Losanges de 15 μ m – espacés de 15 μ m
C	Carrés de 15 μ m – espacés de 15 μ m
D	Carrés de 30 μ m – espacés de 30 μ m
E	Chevrons – espacés de 30 μ m
F	Dégradés de plots de 60, 30 et 15 μ m, espacés de 60, 30 et 15 μ m respectivement

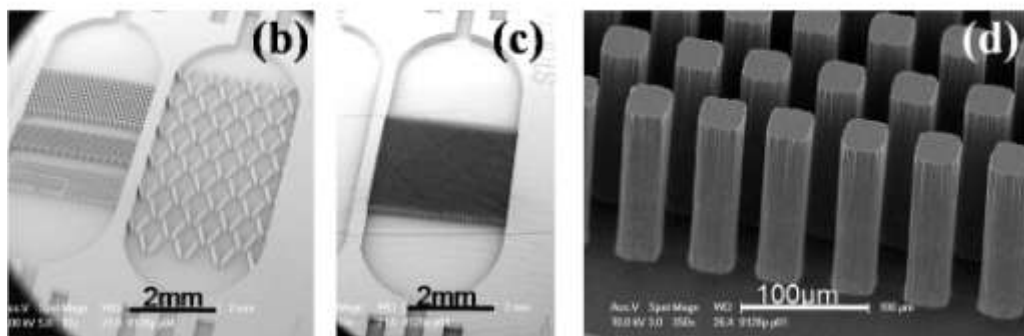


Figure V.4 : Puces à piliers. (a) Tableau récapitulant les différentes puces à piliers et leurs dimensions. (b, c, d) Photographies MEB de quelques puces, (b) puces F et E de gauche à droite, (c) puce C et (d) puce D.

B.2.3. Résultats

Des billes de 10 μ m en suspension dans du PBS ont été injectées à différents débits dans les puces disponibles. La Figure V.5 présente quelques résultats obtenus pour un débit d'injection de 5 μ L/min.

✓ Sur les motifs A et D, aucune cellule sanguine n'est retenue dans le réseau de piliers et aucune déviation des billes n'est observée. Le résultat est comparable pour des billes plus petites car les piliers sont trop espacés. De même, dans le motif E (Figure V.5.a), c'est-à-dire la puce à chevrons, aucune filtration n'a lieu puisque les billes passent sans être déviées tandis que, dans le motif F (Figure V.5.b), aucune rétention de billes n'est visible, quelque soit la zone de piliers considérée.

✓ Le motif C (Figure V.5.c) comprend des filtres plus petits. Pour des conditions d'injection semblables aux précédentes (5 μ L/min), les billes ne passent pas la zone filtrante. En effet, pour 148 μ L d'échantillon injecté, 110 μ L sont récupérés en sortie sans billes, soit un rendement d'extraction de 74%. Mais au-delà de ce volume le liquide ne s'écoule plus, c'est-à-dire que le volume de saturation a été atteint. Pour une injection de sang dilué au 1:10, la puce se bouche très vite.

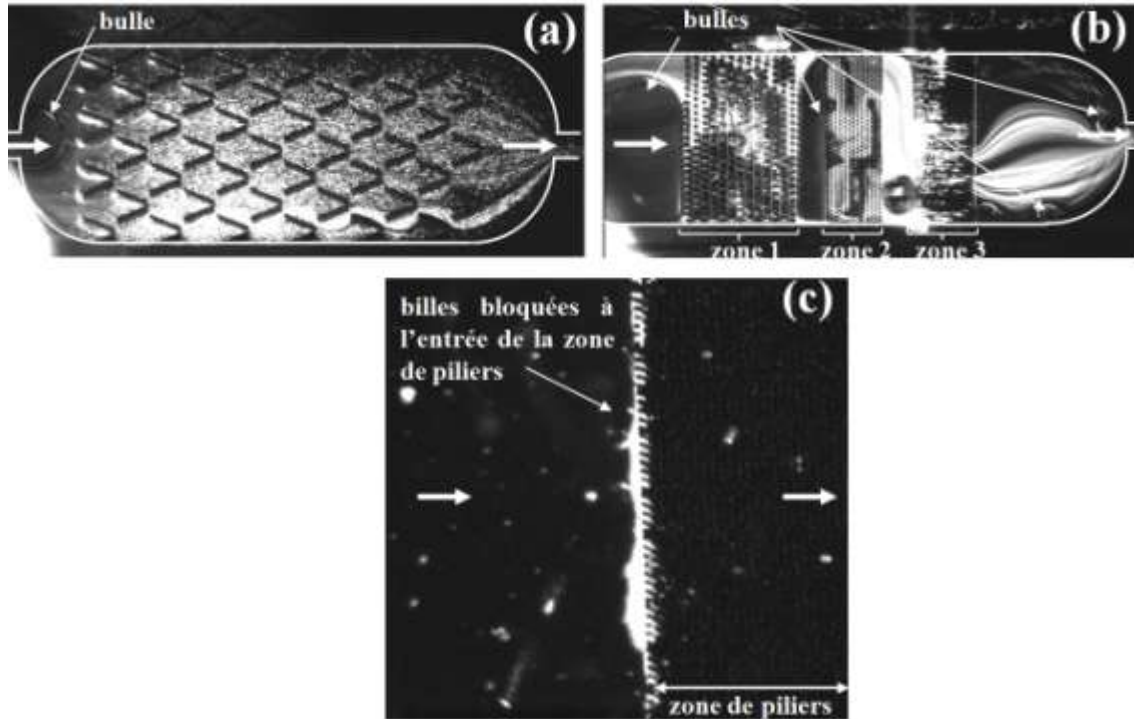


Figure V.5 : Quelques résultats obtenus pour les puces *Piliers*, (a, b, c) respectivement pour les puces E, F et C. Sur l'ensemble des puces considérées, l'écoulement va de gauche à droite. Les petits points ou traits blancs correspondent aux billes observées en fluorescence.

Par ailleurs, dans l'ensemble des puces testées, chaque puce remplit piège des bulles plus ou moins grosses qui perturbent l'écoulement de la suspension dans la chambre. Quelques unes de ces bulles sont visibles dans la Figure V.5. Ce problème est dû à la géométrie des chambres (ouverture très large et arrondie) ainsi qu'à leur mouillabilité vraisemblablement due à la méthode de scellement (scellement anodique qui produit des effets de charges de surface) et au remplissage hétérogène qui en résulte. Cela confirme que les géométries testées ici ne sont pas adéquates et demanderaient à être optimisées, avec en particulier un rapport d'aspect moindre.

B.2.4. Conclusion

Dans le lot technologique réalisé ici, les motifs fabriqués sont beaucoup trop gros et trop espacés à cause des contraintes imposées par la technologie sur le rapport d'aspect. Ces motifs ne sont pas adaptés à une extraction du plasma ou à une séparation de billes de tailles différentes. Pourtant, une fois acceptée la contrainte d'un volume saturant, ce principe de filtration peut être très efficace avec une technologie suffisamment précise.

C. La sédimentation

C.1. Principe

Le principe de la séparation par sédimentation est simple, fondé sur la sédimentation des cellules au fond d'un tube ou d'un canal, du fait de la différence de densité entre le plasma et les différentes cellules. Ce principe est illustré Figure V.6.a. La vitesse de sédimentation varie de 0,27 à 3,8 $\mu\text{m}/\text{s}$ selon le sexe et l'état de santé du patient. En effet, la vitesse de sédimentation est considérée comme un facteur représentatif de l'état pathologique du patient, dans le cas de certaines inflammations par exemple [HAC].

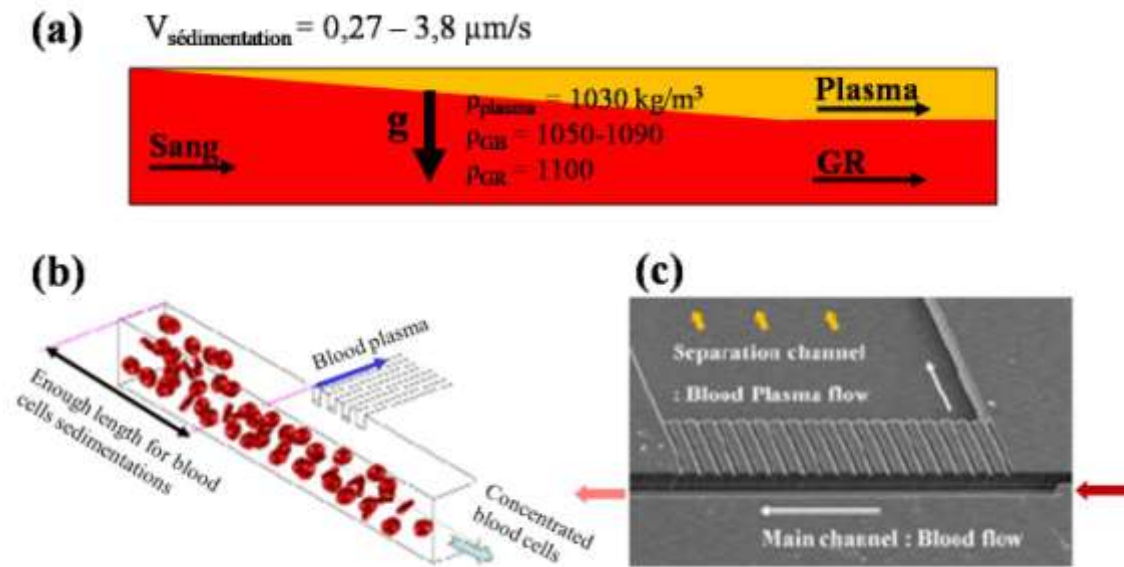


Figure V.6 : Sédimentation. (a) Principe, vue de côté. (b) Principe proposé par Yoon et col. dans [YOO 06] pour l'extraction du plasma par sédimentation. (c) Dispositif associé.

La sédimentation a été appliquée en microsystème [TAC 09], entre autre par l'équipe de Yoon et col. [YOO 06] qui exploite la sédimentation pour extraire le plasma dans des canaux fins et situés dans la partie supérieure du canal principal. Ce principe et le dispositif associé sont présentés dans les Figure V.6.b et c. Le dispositif proposé permet un rendement d'extraction η de 8,6% de plasma, à partir d'un sang non dilué injecté à 0,1 $\mu\text{L}/\text{min}$. 6 à 30 μL peuvent donc être traités en 1h.

C.2. Dispositif

Les puces *Sédim* ont été fabriquées afin de mieux comprendre ce phénomène élémentaire et d'avoir une estimation des débits nécessaires pour visualiser la sédimentation en microsystèmes. Ces puces, schématisées sur la Figure V.7.a, sont des chambres longues de 7,5mm et larges de 2mm. La puce étant placée verticalement, ces dimensions permettent une sédimentation sur 2mm (en 9min à 2h environ).

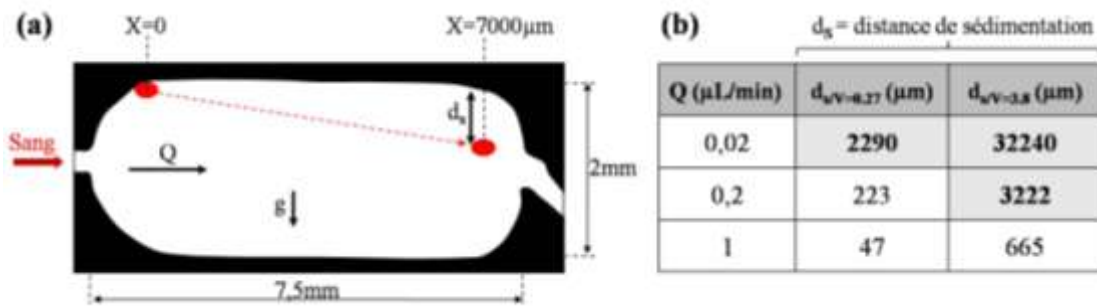


Figure V.7 : (a) Schéma et dimensions d'une puce *Sédim*. (b) Estimation de la distance de sédimentation d_s d'un GR injecté à différents débits pour différentes vitesses de sédimentation. Les cases grisées représentent les cas où la sédimentation maximale a été atteinte ($d_s > 1100 \mu\text{m}$).

Comme illustré sur le schéma de la Figure V.7.a, soit un GR qui part de $X=0$ et arrive en $X=7000 \mu\text{m}$. Le tableau de la Figure V.7.b permet d'approcher, selon la vitesse de sédimentation du patient, la distance de sédimentation d_s parcourue par ce GR pour différents débits d'injection. Sachant que pour un sang non dilué d'hématocrite 45%, on a 55% de plasma soit $d_s = 1100 \mu\text{m}$ au maximum. Ce tableau montre que, quel que soit le débit considéré, la sédimentation est nettement visible à la sortie de la puce. En effet nous obtenons $d_s = 47 \mu\text{m}$ pour $0,27 \mu\text{m}/\text{s}$. Dans ce cas qui est le pire, la région correspondant au plasma fait au moins $47 \mu\text{m}$ de hauteur. Mais ce n'est qu'à $0,02 \mu\text{L}/\text{min}$ qu'une sédimentation complète des GR peut être garantie (c'est-à-dire $d_s > 1100 \mu\text{m}$), quels que soient le patient et la vitesse de sédimentation de son sang.

C.3. Résultats

Du sang complet est injecté à $0,02 \mu\text{L}/\text{min}$ dans la puce *Sédim*. Pour permettre de visualiser la sédimentation, la puce est placée verticalement pendant l'injection. Juste pour l'observation, la puce est lentement ramenée dans le plan du microscope, avec toutes les précautions nécessaires pour ne pas re-mélanger les cellules. La Figure V.8 illustre les résultats obtenus aux temps 5, 10, 30 et 50 min.

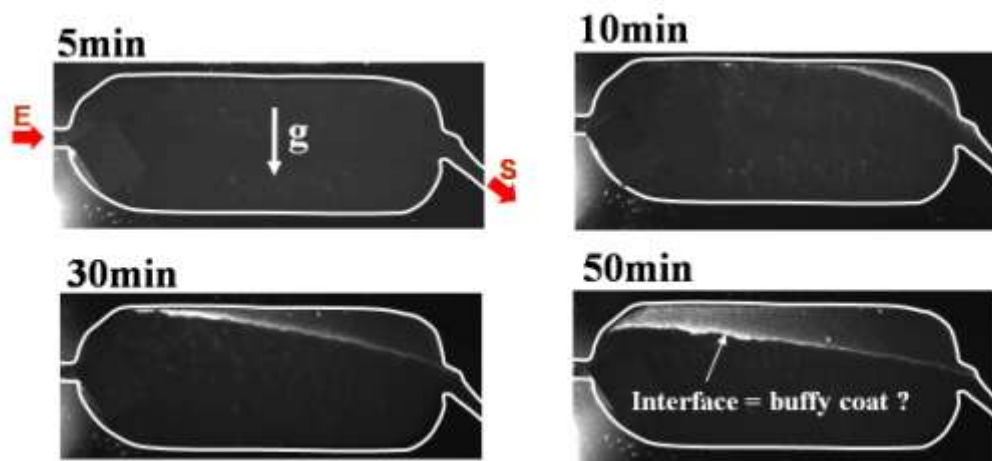


Figure V.8 : Cinétique de sédimentation dans la puce *Sédim*. La puce est placée perpendiculairement au plan de travail pendant l'injection et ramenée dans le plan du microscope uniquement pour l'observation.

La sédimentation est observable dès les 5min suivant le remplissage complet de la chambre, puis s'accroît au cours du temps. On peut très bien distinguer la phase supérieure, claire, et la phase inférieure, beaucoup plus sombre, correspondant aux globules rouges. Il est également probable que l'interface entre le plasma et les GR corresponde au buffy coat mais il faudrait pouvoir réaliser un marquage spécifique en fluorescence des GB et des PLT afin de vérifier que ce n'est pas un artefact dû au mode d'observation.

Ces expériences préliminaires montrent la faisabilité d'utiliser la sédimentation en microsystème avec une géométrie adaptée. En 50min, on a une très bonne séparation du plasma. Cependant, dans notre cas le débit d'injection est vraiment très lent : $0,02\mu\text{L}/\text{min}$. De plus, comme au cours du temps le sang sédimente également dans la seringue, le taux d'hématocrite n'est pas maintenu constant dans le capillaire d'entrée.

Afin d'avoir une sédimentation plus rapide, du sang a également été injecté dans des motifs Serpents à $0,2\mu\text{L}/\text{min}$. Ce dispositif fournit un canal plus long, pour une plus grande distance de sédimentation, ainsi qu'une profondeur moindre, pour une sédimentation plus rapide. Le principe mis en jeu est, comme dans [YOO 06], de combiner l'effet de la sédimentation à celui de la filtration. En effet, la sédimentation peut réduire le colmatage inhérent à la filtration car les GR sédimentent et ne bloquent plus l'entrée des fentes filtrantes. Cependant, malgré un débit plus élevé que précédemment, les problèmes rencontrés restent identiques : le sang sédimente dans la seringue, même en l'agitant et la retournant régulièrement. Il y a également le problème de séchage du sang dans les capillaires, probablement dû à la coagulation résultant de sa mauvaise préparation, et le bouchage de la puce qui en résulte. Pour éviter tous ces problèmes, le débit est ensuite augmenté à $1\mu\text{L}/\text{min}$ mais l'interface plasma / cellules s'en trouve déstabilisée et les deux phases se mélangent.

C.4. Conclusion

Les dispositifs proposés pourraient être optimisés pour en augmenter le rendement mais dans tous les cas, l'approche sédimentation ne pourra pas garantir une séparation avec des débits de l'ordre du $\mu\text{L}/\text{min}$ et plus. En effet, la contrainte majeure de cette technique réside dans la nécessité d'un débit très lent et la difficulté qui en résulte de garder un hématocrite constant dans le sang injecté en entrée. En revanche, son principal intérêt est la possibilité d'utiliser directement du sang complet non dilué et de permettre une séparation globale. La sédimentation est donc une solution prometteuse mais davantage compatible avec des débits d'injection et des volumes faibles.

D. La centrifugation

D.1. Principe

La centrifugation est équivalente à une sédimentation accentuée, où l'accélération due à la gravité est renforcée par la force centrifuge d'un système en rotation, comme le montre l'expression de la vitesse de sédimentation w , dans un liquide supposé immobile, donnée par l'équation (V-2),

$$w = \frac{(\rho_P - \rho_F) r^2}{4,5\mu} g \quad (\text{V-2})$$

où μ est la viscosité du fluide, g l'accélération (due à la gravité ou à la rotation du système) et $(\rho_P - \rho_F)$ la différence des densités massiques du liquide et des particules. Il en résulte que multiplier l'accélération par 100 revient également à multiplier la vitesse de sédimentation par 100. C'est pourquoi il existe de nombreuses tentatives visant à développer le phénomène de centrifugation en microsystèmes.

A cet effet, comme expliqué dans le Chapitre 3, on distingue dans la littérature deux grandes tendances de microsystèmes :

✓ Les chambres de séparation placées sur un CD en rotation, méthode proposée entre autre par [HAE 06]. Pour rappel, ce dispositif ingénieux permet d'extraire 2 μ L de plasma à partir de 5 μ L de sang (soit un rendement η de 40%) en 20sec pour une fréquence de rotation de 40Hz. Cette technique est donc rapide et efficace, d'autant plus que de nombreuses applications biologiques ont depuis été couplées au module élémentaire de séparation. Néanmoins, elle nécessite un appareil actuateur de la rotation, comme un lecteur CD portable par exemple, ce qui rend son intégration difficile dans un système complet.

✓ La force centrifuge induite par l'écoulement dans un canal coudé. Cette fragmentation, qui se fait en continu, est le choix que nous avons fait ici avec l'analyse de l'écoulement dans une spirale. Les phénomènes qui en résultent sont présentés et analysés.

D.2. Dispositif

L'objectif initial de ce dispositif était de centrifuger les particules en injectant l'échantillon à grande vitesse dans une forme spiralée. Intuitivement les particules plus lourdes devraient partir à l'extérieur du canal coudé sous l'effet de la force centrifuge. Pour cela, le dispositif proposé est constitué d'un canal à section carrée de 200 par 200 μ m, tournoyant en spirale sur une longueur totale de 12cm. Le liquide est injecté par le centre de la spirale, au travers d'un trou traversant de part en part la plaque. La spirale se termine en se séparant de manière égale entre deux sorties : les sorties intérieure (I) et extérieure (O) (Figure V.9).

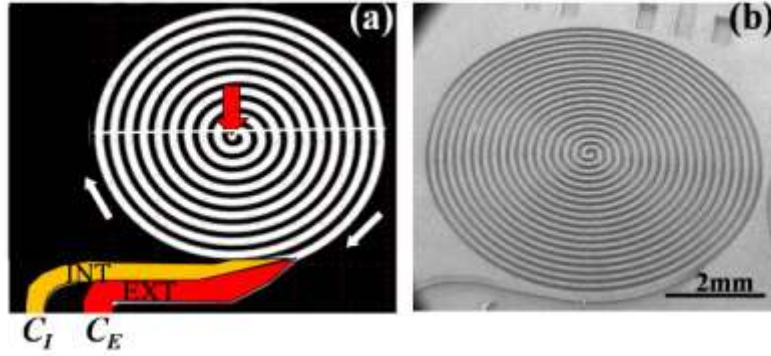


Figure V.9 : Centrifugation en spirale. (a) Schéma du dispositif utilisé. L'échantillon est injecté par le centre de la spirale et ressort de la puce par les deux sorties, intérieure et extérieure. (b) Photographie MEB de la puce Spirale. Les canaux font 200 par 200µm de section.

D.3. Résultats

Les tests sont réalisés avec des billes fluorescentes de 5µm en suspension dans du PBS. En comptant les billes récupérées dans chaque canal de sortie (C_I et C_E étant les concentrations respectives des sorties intérieure et extérieure), la répartition des billes peut être évaluée et reliée aux effets hydrodynamiques correspondants dans la Figure V.10.a. Intuitivement, du fait de l'importante accélération présente dans le canal ($a_c = 62,5 \text{ m/s}^2$ à 300µL/min, calculée pour le rayon de courbure moyen), on s'attendrait à avoir une surconcentration dans la sortie extérieure. En pratique, les écoulements en canal coudé sont complexes et loin d'être intuitifs [BER 83]. Comme le montre ce graphe, un autre phénomène influence la répartition des billes dans la spirale. Des écoulements secondaires, appelés écoulements de Dean, se forment dans les canaux coudés et se superposent à l'écoulement principal axial.

Comme illustré dans la Figure V.10.f, l'origine en est la suivante : le gradient de pression radial, induit par la force centrifuge, entraîne le fluide qui longe les parois inférieure (B) et supérieure (H) de l'extérieur (E) vers l'intérieur (I). Par conservation de la masse, le fluide revient de l'intérieur (I) vers l'extérieur (E) en passant par le plan médian. Une explication plus détaillée de l'établissement de ces écoulements secondaires est disponible en Annexe 2. Globalement, comme schématisés dans la Figure V.10.f, ces écoulements consistent donc en une paire de tourbillons ou vortex hélicoïdaux contre-rotatifs, localisés dans le plan de section de l'écoulement principal, et symétriques par rapport au plan médian.

Le nombre adimensionnel de Dean (D_e), défini dans l'équation (V-3), caractérise cet écoulement en donnant une estimation de la force de ces vortex,

$$D_e = R_e \sqrt{\frac{D_{eq}}{2R}} \text{ avec } R_e = \frac{\rho_f U D_{eq}}{\mu} \text{ et } D_{eq} = \frac{4S}{P} \quad (\text{V-3})$$

où D_{eq} est le diamètre hydraulique, R le rayon de courbure et R_e le nombre de Reynolds avec ρ_f , U , μ , S et P représentant respectivement la densité du fluide, la vitesse moyenne et la viscosité dynamique du fluide, l'aire et le périmètre de la section droite du canal. Les écoulements de Dean apparaissent pour $D_e > 1$.

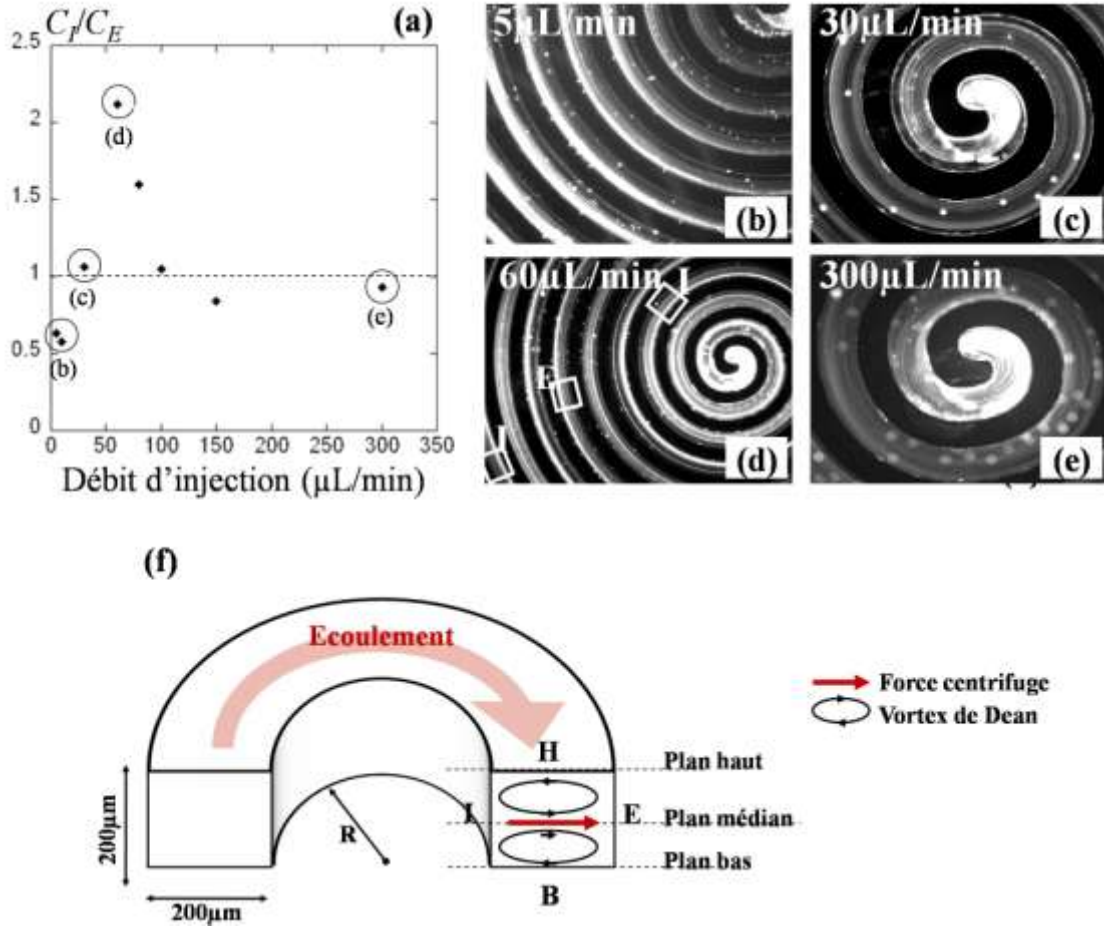


Figure V.10 : Centrifugation en spirale. (a) Evolution du ratio C_I/C_E en fonction du débit d'injection. (b, c, d, e) Photographies de quelques distributions obtenues pour une injection de billes de $5\mu\text{m}$. Les rectangles blancs de l'image (d) illustrent l'alternance de la répartition des billes sur les parois I et E du canal. (f) Schéma des forces s'exerçant sur une particule dans la section d'un canal coudé.

Par conséquent, deux forces principales s'appliquent sur les particules et influencent leur distribution :

✓ La force centrifuge nette (F_C) envoie vers la paroi extérieure du canal (E) les particules ayant une densité volumique supérieure à celle du liquide porteur. Elle est définie par l'équation (V-4),

$$F_C = \frac{4}{3} \pi r^3 (\rho_p - \rho_f) a_c \quad (\text{V-4})$$

avec r le rayon de la particule, ρ_p et ρ_f les densités de la particule et du fluide, a_c l'accélération.

✓ Les écoulements de Dean tendent à mélanger et re-disperser les billes par l'intermédiaire de la force de traînée qui leur est associée (F_D), définie par l'équation (V-5),

$$F_D = 6\pi\mu r (U_p - u) \quad (\text{V-5})$$

avec U_p la vitesse de la particule et u la vitesse de l'écoulement non perturbé vu par la particule. Cette force entraîne les particules le long de ces vortex et confère à leur trajectoire un mouvement hélicoïdal.

On remarque que F_D et F_C dépendent toutes les deux de la taille de la particule r mais F_D est proportionnel à r tandis que F_C est proportionnel à r^3 , ce qui laisse envisager qu'une séparation par taille est possible. De plus, à très petite taille, la force centrifuge F_C disparaît au profit de la traînée F_D : les particules tendent à marquer l'écoulement.

Observons maintenant l'influence du débit sur ces forces :

- ✓ Pour des débits faibles ($<10\mu\text{L/min}$, $De < 0,48$, Figure V.10.b), les billes sont principalement concentrées à l'extérieur des canaux (facteur 2) sous l'effet de la force centrifuge. Pendant qu'elles circulent dans la spirale les billes, plus denses que la phase liquide, se déplacent vers le mur extérieur du canal.
- ✓ Pour des débits intermédiaires ($10-30\mu\text{L/min}$, $0,48 < De < 1,49$, Figure V.10.c), les vortex de Dean apparaissent, s'opposent à la force centrifuge et tendent à re-mélanger les billes. La partie des vortex dirigée vers l'intérieur du coude entraîne les billes dans le sens opposé à celui de la force centrifuge. Il n'y a plus de séparation ($C_I = C_E$).
- ✓ Pour des débits plus importants ($30-300\mu\text{L/min}$, $1,49 < De < 14,9$, Figure V.10.e), l'effet Dean devient prédominant devant l'effet centrifuge. Il en résulte une répartition alternativement entre les parois (I) et (E) du canal, au fur et à mesure qu'on se déplace dans la spirale. En effet, les billes suivent la trajectoire définie par les vortex de Dean, passant successivement de l'intérieur (I) à l'extérieur (E) du canal et ce jusqu'à la sortie de la spirale. Cette périodicité dans le mouvement des billes dépend du nombre de Dean et donc du débit d'injection. C'est pourquoi il semble possible de concentrer les particules du fluide sur une des deux sorties du dispositif en réglant le bon débit. Ici, la séparation optimale est obtenue à $60\mu\text{L/min}$, avec un ratio $C_I/C_E > 2$ ($0,84 < De < 2,98$, Figure V.10.d).

Notre système d'injection (principalement la connectique et les pertes de charge associées) ne permet pas de monter à des débits supérieurs à $300\mu\text{L/min}$ (Chapitre 9). Malgré tout, ces résultats sont semblables à ceux de Gregoratto et col. présentés dans [GRE 07]. L'étude de ces écoulements secondaires fait l'objet de nombreuses publications, où la démarche la plus communément mise en œuvre consiste à rendre dominante la force centrifuge, la force de Dean étant alors considérée comme une force perturbatrice que l'on essaie de réduire [OOK 04, OOK 06, SEO 07, BHA 08].

Des essais ont également été menés sur du sang dilué 1:10 mais n'ont donné aucun résultat car la visualisation du sang en flux à ces débits est très difficile dans nos conditions expérimentales.

D.4. Conclusion

La centrifugation en *Spirale* permettrait une séparation continue et à haut débit, sans la nécessité d'une interface filtrante et donc sans le problème de colmatage qui en résulte. Mais des écoulements secondaires apparaissent dans un canal coudé. Ces vortex de Dean, très vite prédominants sur la force centrifuge, s'opposent au pouvoir séparateur de celle-ci et rendent problématique toute extraction efficace.

Par ailleurs, le cas du sang est encore une fois beaucoup plus compliqué que celui, parfait, des billes sphériques et rigides, le sang étant un fluide complexe, non newtonien et composé à 50% de cellules déformables. Pour toutes ces raisons, l'utilisation d'une spirale pour la fragmentation sanguine est une voie difficile. Néanmoins, la visualisation

de ces vortex de Dean a suggéré des pistes intéressantes qui feront l'objet d'études plus approfondies par la suite (Chapitre 6).

E. Evaluation comparative

Au cours de ce chapitre, quelques principes de microfluidique passive ont été évalués en vue du fractionnement sanguin ; la microfiltration, la sédimentation et la centrifugation en spirale. L'ensemble des résultats obtenus est récapitulé dans le Tableau V-1.

Le but initial de ce lot technologique, qui était de séparer simultanément les différents éléments du sang, à partir de sang peu ou pas dilué, de façon continue et rapide (de l'ordre du 100 μ L/min), n'a pas été atteint. Il est évident que des compromis sont nécessaires selon l'application ciblée (entre rendement d'extraction, vitesse, dilution...) et que différents principes doivent être couplés en vue d'un fractionnement total intégré.

De façon générale, les expériences ont été menées sur des suspensions de billes et sur du sang dilué ou non. Certains principes de séparation s'avèrent efficaces pour les billes mais beaucoup moins pour le sang, du fait de la proportion importante des cellules, de leur déformabilité et de leur fragilité.

✓ La filtration transverse n'a pas apporté tous les résultats escomptés. D'abord parce que les géométries n'étaient pas adéquates (trop courtes, hauteur de filtre non optimisée...), ensuite parce que ces filtres finissent dans tous les cas obstrués par les globules rouges. Ces problèmes sont classiques dans la bibliographie. La filtration transverse peut effectivement être une solution efficace dans le cas du sang mais au prix d'une dilution très importante de l'échantillon, d'un débit d'injection lent et d'une géométrie optimisée (c'est-à-dire également un contrôle très précis des dimensions, donc de la technologie utilisée). Et même dans le meilleur des cas, à cause de cet inévitable colmatage des pores, cela reste une solution dont la durée d'utilisation est limitée dans le temps.

✓ Tous les dispositifs de type piliers en chambre fluide ont été un échec principalement à cause des limitations dimensionnelles de notre fabrication. Ils ne permettent ni filtration ni déviation des billes et cellules.

✓ Les motifs *Sédimentation* ont montré des résultats intéressants de fragmentation grossière. C'est le seul dispositif pour lequel une ségrégation des différentes phases est facilement possible, qui plus est à partir de sang total. Mais les temps d'injection mis en jeu sont beaucoup trop longs.

✓ La centrifugation en *Spirale* nous apporte de nouvelles connaissances en microfluidique et notamment sur les écoulements secondaires dans les canaux coudés. Aucune séparation n'a pu être constatée avec du sang, même dilué, mais l'aspect théorique et pratique de ces vortex de Dean est prometteur. Des études supplémentaires permettront d'en savoir plus sur ce phénomène et son pouvoir de séparation. Ce sera l'objectif du Chapitre 6.

	Microfiltration	Centrifugation	Sédimentation
Billes	✓ Extraction maximum de 60% à 10 μ L/min. ✓ Pas de contamination.	✓ Appauvrissement d'un facteur 2,6 à 150 μ L/min.	Pas testé.
Sang 1:10	✓ Extraction < 5% à 10 μ L/min. ✗ Hémolyse. ✗ Colmatage.	✓ Phénomènes observés intéressants et exploitables : les écoulements de Dean.	Pas testé.
Sang non dilué	✗ Non réalisable sur sang non dilué.	✗ Visualisation difficile. ✗ Colmatage.	✓ Sédimentation visible en 10min à 0,02 μ L/min.
-	✗ Problème du colmatage au cours du temps. ✗ Risque élevé d'hémolyse. ✗ Nécessité d'une fabrication complexe et précise pour le dimensionnement des pores. ✗ Nécessité d'une dilution importante de l'échantillon de sang. ✗ Faible débit préférable.	✗ Complexité due au couplage des phénomènes hydrodynamiques qui interviennent (multiparamétriques).	✗ Débit très lent (sédimentation dans la seringue et séchage du sang dans la connectique).
+	✓ Très efficace dans un temps donné pour des billes ou des cellules peu déformables.	✓ Dispositif et fabrication simple. ✓ Pas de problème de colmatage. ✓ Séparation à haut débit.	✓ Ségrégation des différentes phases du sang. ✓ Utilisable sur sang complet.

Tableau V-1 : Comparaison quantitative et qualitative des différents principes fluidiques testés.

F. Conclusion et perspectives

Ainsi, au cours de ce chapitre, quelques phénomènes hydrodynamiques connus et rapportés dans la littérature ont été évalués en vue de la fragmentation sanguine, tels que la filtration, la sédimentation et la centrifugation. D'autres phénomènes ont été mis en évidence comme les écoulements de Dean. Il en résulte une série d'outils hydrodynamiques, chacun ayant ses avantages et inconvénients selon l'application choisie.

Cette comparaison expérimentale a fait l'objet de deux communications [SOL 07, SOL 08] et a été en partie présentée dans la publication [SOL 09.1].

Mais à l'issue de ces différents essais, aucun principe ne nous a semblé permettre une étude de faisabilité à court terme pour une fragmentation sanguine. C'est pourquoi il a fallu imaginer des nouvelles solutions :

✓ Des pistes intéressantes sont apparues dans la littérature, proposant un tri des éléments sanguins par biomimétisme, comme expliqué dans l'état de l'art du Chapitre 3. En particulier, l'exploitation de la migration latérale des GR dans la section d'un canal pour l'extraction du plasma [PAR 05, YAN 06, JAG 07] semble très prometteuse. Ce principe semble purement passif et ne nécessite pas de motif filtrant. Les dispositifs proposés sont donc simples, sans dimension limitante autre que la restriction du canal, et ne requièrent par conséquent pas de technologie complexe de fabrication. Pour toutes ces raisons, ce principe paraît intéressant et fera l'objet d'études approfondies dans le Chapitre 6, puis sera exploité en particulier pour l'extraction du plasma dans le Chapitre 8. En parallèle, des expériences supplémentaires seront réalisées en canal coudé dans le Chapitre 7, afin d'exploiter davantage et de façon originale les vortex de Dean mis en évidence ici.

✓ Par ailleurs, au vu des compétences disponibles dans le laboratoire en fonctionnalisation des surfaces, une nouvelle piste sera étudiée, en vue du tri cellulaire, fondée sur la capture spécifique des cellules. Ce travail fera l'objet des Chapitres 9 et 10 de la partie 4.

Partie 3 : Développement de solutions fondées sur la migration latérale

***L**a Partie 3 se penche sur le couplage original de différents principes de microfluidique passive. En particulier, le phénomène de la migration latérale est discuté dans le Chapitre 6. Associée à d'autres phénomènes fluidiques (comme les écoulements dans des singularités géométriques), la migration latérale est à l'origine de diverses techniques exploitables en vue de notre application. Le Chapitre 7 propose deux géométries, caractérisées par un canal coudé et l'exploitation de cette migration latérale. Elles constituent nos premières tentatives microfluidiques originales en vue de la séparation liquide vs particules d'une suspension. Le Chapitre 8, quant à lui, permet le développement et la validation de dispositifs pour l'extraction du plasma. Ceux-ci sont fondés sur l'expansion de la migration latérale par le couplage des phénomènes définis précédemment.*

VI. Aspects fondamentaux

Le développement de solutions innovantes pour le fractionnement sanguin, fondées sur la microfluidique passive, passe par la compréhension d'un certain nombre de phénomènes physiques élémentaires dont il faut tirer partie au mieux ; ce chapitre rappelle brièvement ces phénomènes. Une première section est centrée sur le comportement mécanique d'un GR, et plus particulièrement sur le phénomène de migration latérale. Les deux sections suivantes proposent des dispositifs fluidiques pour amplifier ce phénomène et l'exploiter. Dans tous les cas, le modèle d'écoulement de base à partir duquel différents aménagements sont proposés est l'écoulement de Poiseuille.

A. Comportement mécanique d'un globule dans un canal et migration latérale

De nombreuses études sont menées sur le comportement mécanique d'un GR dans un microcanal, mais la prédiction de ce comportement comporte des problèmes non triviaux qui ne sont pas encore totalement résolus [ABK 08]. Ce comportement se caractérise par deux aspects :

- ✓ Un premier aspect, macroscopique, concerne le positionnement préférentiel des GR charriés par un écoulement de Poiseuille dans un canal. Ce positionnement conditionne la structuration de tout l'écoulement et de sa population d'éléments figurés, avec une concentration non uniforme des GR dans la section du canal, et en particulier l'apparition d'une couche claire près des parois. Un phénomène essentiel pour expliquer cette répartition hétérogène est la migration latérale, qui résulte elle-même de l'existence de forces de portance qui s'appliquent sur les GR. Ces phénomènes de migration ont également été observés sur bien d'autres particules, comme des sphères, des ellipsoïdes, des disques solides, des bulles ou des gouttes [LAW 67].
- ✓ Un second aspect, microscopique, concerne les déformations et mouvements locaux d'un GR dans un champ de vitesse cisailé. Cet aspect, propre aux GR, est en partie couplé au précédent mais il n'est cependant pas essentiel pour expliquer le phénomène de migration latérale. Il sera néanmoins rappelé pour mémoire.

L'étude d'une seule particule isolée dans un écoulement de Poiseuille ne peut permettre de prédire l'ensemble des phénomènes observés, qui sont des phénomènes collectifs. En particulier, la présence des particules en dehors de la couche claire modifie le profil radial de vitesse de la phase porteuse (le plasma) en augmentant la viscosité du mélange : ce profil s'aplatit. Il est néanmoins intéressant d'en présenter quelques caractéristiques essentielles qui seront éclairantes pour la suite. Par ailleurs, on s'éloignera dans un premier temps du cas du GR, en prenant comme modèle soit une sphère rigide soit une goutte déformable.

La littérature dans ce domaine étant importante, il convient de se focaliser sur les études qui sont pertinentes du point de vue des paramètres hydrodynamiques mis en jeu. Ainsi, on se limitera aux cas pour lesquels l'écoulement perturbé autour de la particule considérée est à faible nombre de Reynolds. On se limitera également aux études concernant les particules dites neutres, pour lesquelles il n'y a pas d'effet de glissement par rapport au fluide environnant. Ces particules, qualifiées de « neutrally buoyant » en anglais, sont de bons modèles pour les GR qui ont une densité voisine de l'unité. Le seul nombre de Reynolds de la particule est alors Ga^2/ν , où G est le gradient de vitesse imposé en tout point dans un écoulement de Poiseuille (ou cisaillement).

On distingue alors deux cas : (1) les écoulements à très bas nombre de Reynolds, où les effets inertiels sont pratiquement négligeables, et (2) les écoulements à bas nombre de Reynolds où ces effets inertiels, même faibles, interviennent. Des phénomènes de migration latérale sont observés dans ces deux cas mais pour des raisons différentes :

(1) A très bas nombre de Reynolds, les particules sphériques et rigides ne subissent pas de migration latérale. Ce résultat a été théoriquement prouvé par Bretherton en 1962 [BRE 62] pour n'importe quel corps de révolution. Plus récemment, Olla [OLL 97] a expérimentalement montré que des billes suivent l'écoulement axial tout en tournant sur elles-mêmes. En revanche, même en l'absence de forces inertiels, les gouttes subissent une force de portance visqueuse due à leur déformabilité.

- Comme le montre l'article théorique majeur de Chan et Leal [CHA 79], l'existence de cette force de portance, qui dépend évidemment du cisaillement, requiert également deux ingrédients supplémentaires indispensables : la présence d'une paroi et/ou la courbure du profil de vitesse non perturbé. Ces deux éléments sont bien présents dans le cas de l'écoulement de Poiseuille (et non dans celui de l'écoulement de Couette).

- Puis d'autres paramètres interviennent et modulent cette portance : il y a tout d'abord le facteur d'échelle, qui traduit une légère déformation par rapport à la forme sphérique. Il est lié à un nombre de capillarité, rapport des forces visqueuses sur les forces de tension interfaciale qui tendent à maintenir la forme sphérique. Point important, nous le verrons par la suite, la force de portance croît avec ce facteur. Puis la force de portance dépend du rayon de la goutte à l'équilibre rapportée sur la largeur du canal. Enfin, la force de portance dépend également du rapport κ des viscosités du fluide interne et du fluide porteur.

- Suivant la prépondérance relative des deux ingrédients de base de cette force (c'est-à-dire pour rappel la paroi et la courbure du profil de vitesse), différents comportements sont prédits par les formes limites de l'expression générale de la force de portance. (i) Si les effets de parois sont négligés, il apparaît une fenêtre $0,5 < \kappa < 10$ dans laquelle la portance est dirigée vers la paroi. En dehors de cette fenêtre la portance est dirigée vers l'axe du canal. (ii) En revanche, si les effets de parois sont prépondérants, la portance tend à éloigner la goutte de la paroi, quelle que soit la valeur de κ .

(2) A bas nombre de Reynolds, en présence d'effets inertiels même très faibles, les particules sphériques et rigides subissent une migration latérale. Ce phénomène a été mis en évidence par Segré et Silberberg [SEG 62] dans des écoulements de Poiseuille. Leur positionnement préférentiel final résulte de deux effets inertiels qui s'opposent [SCH 89] : (i) l'interaction avec la paroi induit une première force de portance qui éloigne la particule de celle-ci, tandis que (ii) le cisaillement et la courbure du profil de vitesse produisent une migration du centre du canal vers la paroi. Il en résulte l'alignement des particules dans la section du canal sur une position d'équilibre illustrée

Figure VI.1 et qui porte le nom de « tubular pinch effect ». Une expression de cette force résultante a été proposée par Asmolov dans [ASM 99],

$$F_{L/Billes} \propto \rho_f \left(\frac{2U_f}{D_h} \right)^2 R^4 \quad (\text{VI-1})$$

avec ρ la densité du fluide, U_f la vitesse moyenne du fluide, D_h le diamètre hydraulique du canal et R le diamètre de la particule. La dépendance de cette force en R^4 illustre que ces effets inertiels seront d'autant plus importants que la particule sera grande.

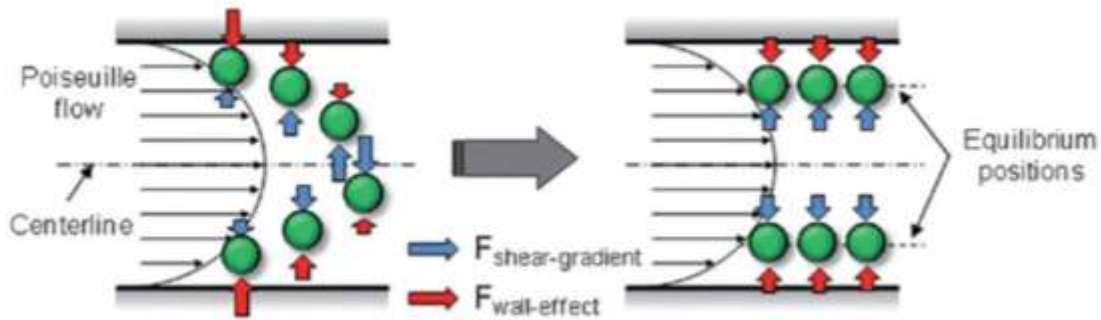


Figure VI.1 : Schématisation des effets inertiels qui s'appliquent sur des sphères rigides en mouvement dans un écoulement de Poiseuille. Conséquence sur la répartition des particules et positionnement préférentiel. Schéma extrait de [PAR 09].

Passons maintenant à la transposition de ces considérations au cas des GR. On peut en effet classer leur comportement en deux catégories récapitulées dans le Tableau VI-1 :

(1) A très bas nombre de Reynolds, les GR subissent une force de portance visqueuse due à leur déformabilité. Cette force, qui dépend du cisaillement, repousse les GR de la paroi du canal. Dans cette configuration, le mouvement du GR s'appelle la chenille de char (« tank-treading ») : la cellule garde une orientation fixe par rapport au flux alors que sa membrane suit une rotation.

(2) A bas nombre de Reynolds, en présence d'effets inertiels même très faibles, les GR subissent une migration latérale de même que les particules sphériques et rigides. Dans cette configuration, le mouvement du GR s'appelle la bascule (« tumbling ») : la cellule tourne en bloc, comme une particule rigide.


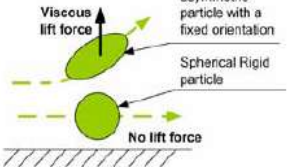


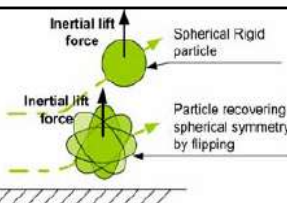
Regime and reference	Reynolds number	Viscosity ratio between inner and outer fluids	Movement of cell	Photographic evidence*	Predominant lateral force	Effect in microchannel
A (tank-treading [16])	Very Low (<1)	Low	Tank-treading		Viscous lift force	
B (Swinging [17])	Low	Medium	Swinging		Transition regime	The different effects on the cells are not known and therefore no drawing can be provided here.
C (Tumbling [16])	Very low to Low (~1)	High	Tumbling		Inertial lift force	

Tableau VI-1 : Tableau récapitulant les différents comportements d'un GR dans un microcanal. Tableau proposé par Kersaudy-Kerhoas et col. dans [KER 09].

Au vu des dimensions de nos microsystèmes et des débits d'injection utilisés, nous serons généralement dans ce dernier cas, en présence d'effets inertiels ($Re \geq 1$). Cela signifie que cette migration latérale sera présente nécessairement pour les GR. Il en résulte le profil de répartition suivant dans la section du canal (Figure VI.2.a) : une zone sans particules apparaît au voisinage des parois du canal (1), suivie d'une zone très concentrée un peu plus loin (2), jusqu'à la zone centrale où la concentration est homogène (3). Dans le cas particulier du sang, cette zone sans particules s'appelle la couche appauvrie (ou « cell-free layer »). Lorsque le canal possède une section rectangulaire, le profil obtenu est ovale (Figure VI.2.b).

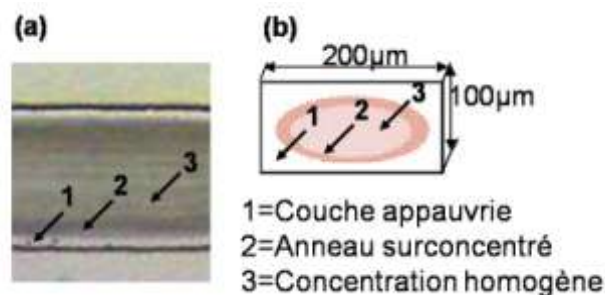


Figure VI.2 : Schématisation des effets inertiels qui s'appliquent sur des sphères rigides en mouvement dans un écoulement de Poiseuille. Conséquence sur la répartition des particules et positionnement préférentiel.

Voyons maintenant quelques moyens envisageables pour amplifier cette migration latérale et en particulier la couche appauvrie.

B. Écoulements en singularités géométriques

L'état de l'art mené dans le Chapitre 1, sur la composition du sang et son écoulement dans le système vasculaire, a permis de découvrir des phénomènes fluidiques originaux tels que la sténose et les recirculations qui en résultent. Nous nous sommes intéressés à la transposition en microsysteme de ces écoulements caractéristiques [GOL 77].

B.1. Singularités géométriques et généralités

Les écoulements en singularités géométriques font l'objet de nombreuses études en mécanique des fluides. Ces singularités peuvent être des élargissements brusques, des cavités de différentes géométries ouvertes sur le canal, des restrictions, ou alors des obstacles internes au canal et de forme non profilée qui vont modifier localement l'écoulement. Celui-ci se caractérise par l'apparition de tourbillons (ou recirculations) dans ces singularités (Figure VI.3). Ce phénomène se manifeste généralement par l'apparition d'un tourbillon principal, dont l'entraînement se fait via une interface fluide qui le sépare de l'écoulement axial. Ce tourbillon peut être associé le cas échéant à des tourbillons marginaux beaucoup plus petits.

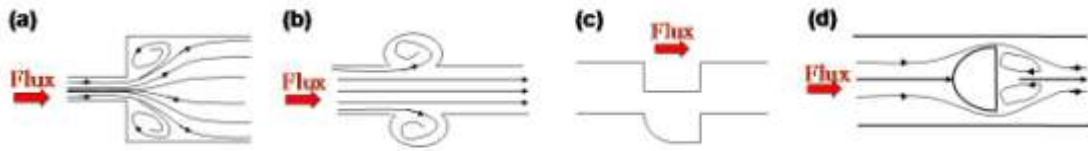


Figure VI.3 : Recirculations dans différents types de singularités géométriques. (a) Elargissement brusque du canal. (b) Cavités le long du canal. (c) Différentes géométries de cavités. (d) Obstacle.

Considérons un exemple classique, l'élargissement brusque du canal, qui fait l'objet de nombreuses études, comme par exemple dans [ALL 97, HAW 01]. Le problème associé à cette singularité, schématisé Figure VI.3.a se définit par le nombre de Reynolds amont (Re_1) ainsi que par certains paramètres géométriques adimensionnels. Soient E le rapport d'expansion du canal et A son asymétrie,

$$E = \frac{d_2}{d_1} \quad (\text{VI-2})$$

$$A = \frac{h_1 - h_2}{d_1} \quad (\text{VI-3})$$

avec d_1 et d_2 les largeurs amont et aval du canal, h_1 et h_2 les largeurs d'ouverture. Dans les géométries qui seront considérées au cours de ce travail de thèse, l'élargissement sera symétrique par rapport à l'axe du canal ($h_1 = h_2$). Par conséquent, le paramètre A sera toujours nul.

Contrairement aux idées reçues, des zones de recirculations peuvent être présentes dans les coins d'un tel élargissement (Figure VI.4) même à très bas nombre de Reynolds ($Re \rightarrow 0$) ; on les appelle les vortex de Moffatt [MOF 64]. Alleborn et col. [ALL 97] présentent quelques résultats expérimentaux obtenus pour des expansions géométriques de rapport 2 et 3 et s'intéressent à l'évolution du comportement fluide dans cet élargissement en fonction du nombre de Reynolds. A bas nombre de Reynolds, l'écoulement est stable et symétrique, constitué de deux zones de recirculations

d'extension identique et localisées dans les coins de l'élargissement (Figure VI.4.b en haut). L'ampleur de ces recirculations augmente avec le nombre de Reynolds. A partir d'un nombre de Reynolds donné, appelé Reynolds critique (Re_C), cet écoulement symétrique bascule en une paire de vortex stables et asymétriques ; les deux zones de recirculations ont des longueurs différentes (Figure VI.4.b en bas). Ce Reynolds critique dépend du ratio d'expansion géométrique. Il définit une bifurcation, c'est-à-dire qu'il délimite un autre type de configuration d'écoulement. Dans [HAW 01], sa valeur est de 53,8 pour une expansion 2D d'un facteur 3.

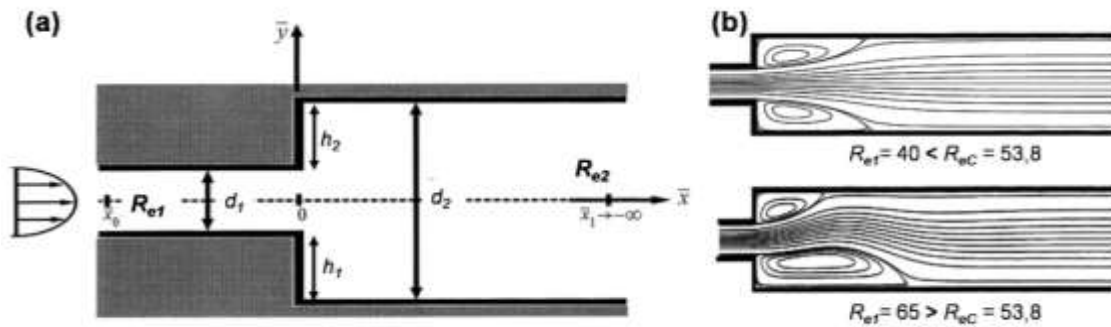


Figure VI.4 : Écoulement laminaire dans un canal avec élargissement brusque, d'après [HAW 01]. (a) Définition géométrique du problème et paramètres adimensionnels. (b) Lignes de courant obtenues par modélisation pour une expansion d'un facteur 3. Configurations d'écoulement obtenues pour $Re_1 = 40$ et 65.

Dans nos microsystemes, nous serons à des nombres de Reynolds bien inférieurs à celui correspondant à cette bifurcation. En revanche, compte-tenu de nos moyens de visualisation, nous n'avons pas pu constater la permanence des tourbillons de Moffatt à très bas nombre de Reynolds.

B.2. Singularités géométriques et fractionnement sanguin

Le pouvoir séparateur des recirculations n'est exploité que depuis peu de temps en microsystemes. L'intérêt de ces écoulements a été mis en évidence par Chiu et col. dans [SHE 03, CHI 07], qui proposent une étude sur la formation de recirculations dans des géométries adaptées et leur modélisation afin d'avoir une accélération radiale (donc une force centrifuge) la plus forte possible (10^6g) (Figure VI.5). L'application ciblée est bien spécifique : des tourbillons sont induits dans les singularités proposées afin de permettre un contrôle par rotation de l'environnement (c'est-à-dire de la solution) autour d'une cellule unique placée dans cette singularité. L'application tri de particules par force centrifuge en micro vortex est proposée mais suivie d'aucune exploitation. Par ailleurs, Manbachi et col. [MAN 08] étudient et utilisent les microcirculations apparaissant dans des cavités rectangulaires en vue de l'immobilisation et l'analyse de cellules dans celles-ci. Park et col. [PAR 09], quant à eux, utilisent ces vortex mais pour une focalisation continue de billes rigides loin des parois, et non pour l'étude des cellules sanguines.

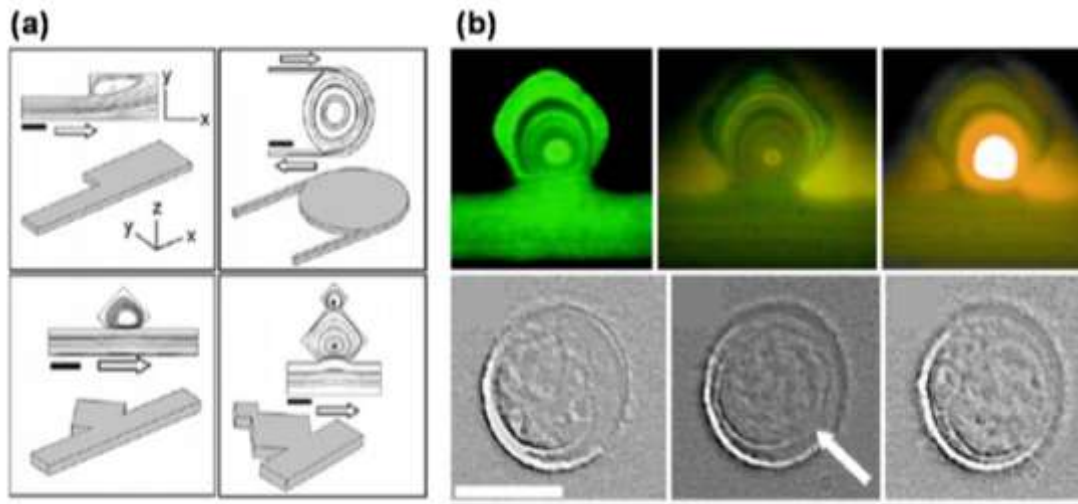


Figure VI.5 : Recirculations en singularités géométriques et travaux de Chiu et col. [CHI 07] (a) Simulations des conditions pour la formation des tourbillons. (b) Différentes applications du micro tourbillon avec, en haut, la séparation de billes selon leur densité, en bas, la rotation contrôlée d'un lymphocyte placé dans la cavité et étude de sa membrane.

L'exploitation de ces écoulements en singularités géométriques pour l'augmentation locale de la couche claire apparaît comme une idée originale. A cet effet, deux singularités sont proposées et schématisées dans les Figure VI.6.a et b : l'élargissement brusque est symétrique, caractérisé par un facteur d'expansion égal à 3 pour une largeur de canal de 200 à 600 μm tandis que les cavités, circulaires de diamètre égal à 200 μm , sont placées symétriquement le long du canal.

Du sang dilué au 1:20, auquel ont été ajoutées des billes fluorescentes de 0,5 μm , est injecté dans les deux types de singularités. Ces dernières, en faible quantité, petites et légères (Chapitre 4), deviennent des marqueurs de l'écoulement. L'écoulement des GR ainsi que les lignes de flux visualisées pour les billes sont présentés dans les Figure VI.6.c et d pour différents nombres de Reynolds :

- ✓ Dans les deux géométries, quelque soit le débit, les singularités sont alimentées avec le plasma de la couche appauvrie et permettent d'augmenter localement cette zone claire.
- ✓ Puis, comme le débit et le nombre de Reynolds équivalent augmentent, les configurations visualisées dans les singularités évoluent. A 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, aucune recirculation n'est visible ; l'écoulement semble coller à la paroi (problème de l'existence des tourbillons de Moffatt). A 200 $\mu\text{L}/\text{min}$, des recirculations sont visibles dans les deux types de singularités et occupent une majeure partie de l'étendue des cavités.
- ✓ On peut voir quelques GR entrer dans ces tourbillons, en ressortir et retourner dans l'écoulement principal. Ce résultat s'explique ainsi : chaque cellule plus lourde que le liquide environnant et localisée dans le tourbillon est soumise à deux forces, une force centrifuge qui tend à l'éloigner du centre du tourbillon et une force de portance qui l'en rapproche. Pour une cellule suffisamment grande, la force centrifuge prédomine sur la force de portance. La cellule peut alors traverser l'interface fluide d'entraînement et ne plus être piégée dans le tourbillon ; elle est éjectée et retourne dans l'écoulement principal. Les autres cellules se retrouvent bloquées dans un anneau centré sur l'axe du tourbillon, laissant ainsi une zone appauvrie au centre du tourbillon et auprès de la paroi.

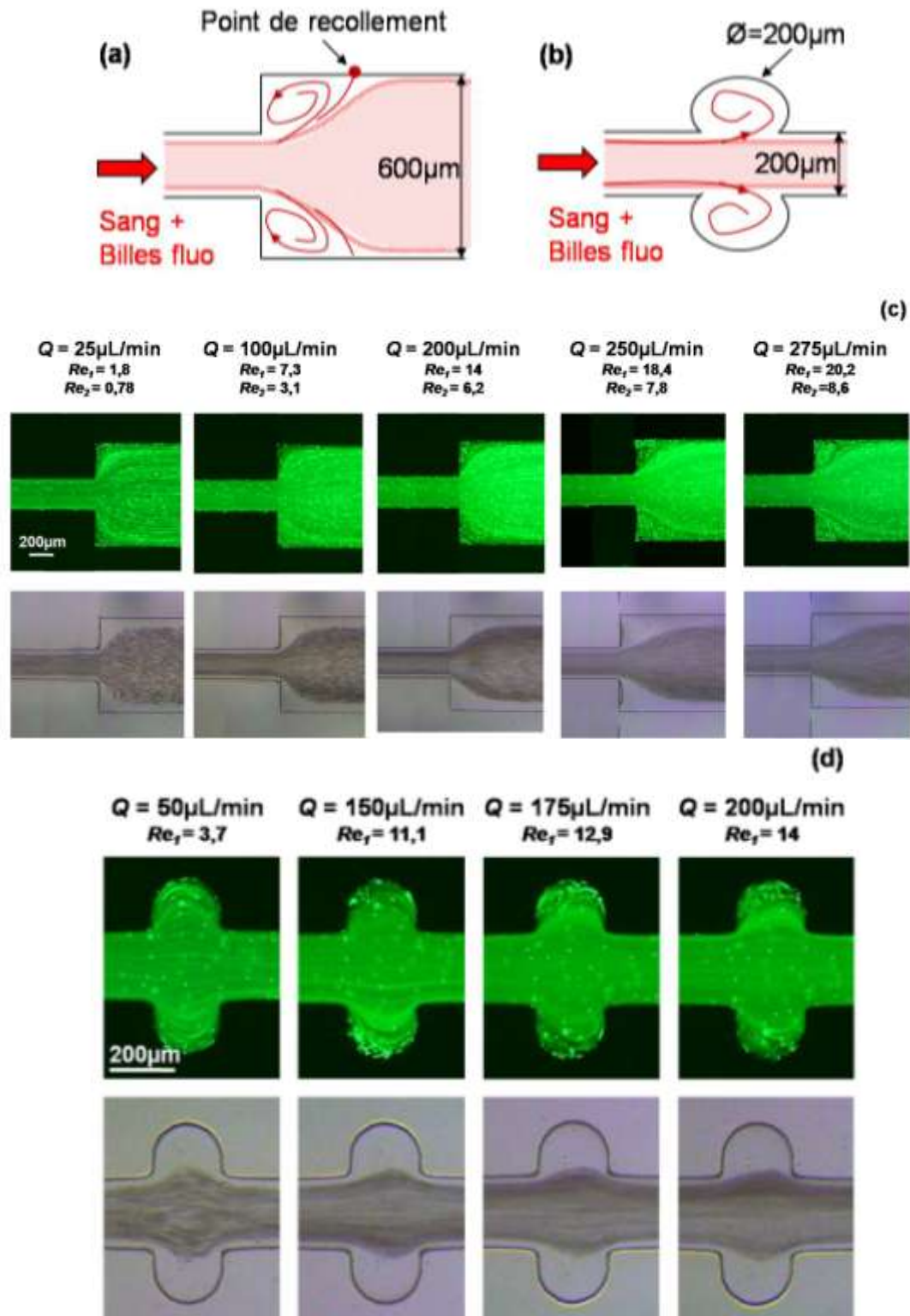


Figure VI.6 : Ecoulements en singularités géométriques, (a, b) Elargissement et Cavitité. (c, d) Injection d'un mélange de sang 1:20 et de billes fluorescentes à différents débits et différents nombres de Reynolds.

Ainsi, l'écoulement d'un échantillon sanguin dans des singularités géométriques a été observé et a permis de visualiser une augmentation locale et importante de la zone claire. Il reste à exploiter ce principe en essayant l'extraction du plasma dans cette région.

C. Effet restriction

C.1. Effet restriction et généralités

L'effet restriction a été introduit par Faivre et col. dans [FAI 06] comme suit : une restriction géométrique du canal induit une augmentation de la couche appauvrie. En effet, comme visualisé sur la Figure VI.7.a, la largeur de la couche appauvrie en aval de la restriction est supérieure à celle observée en amont.

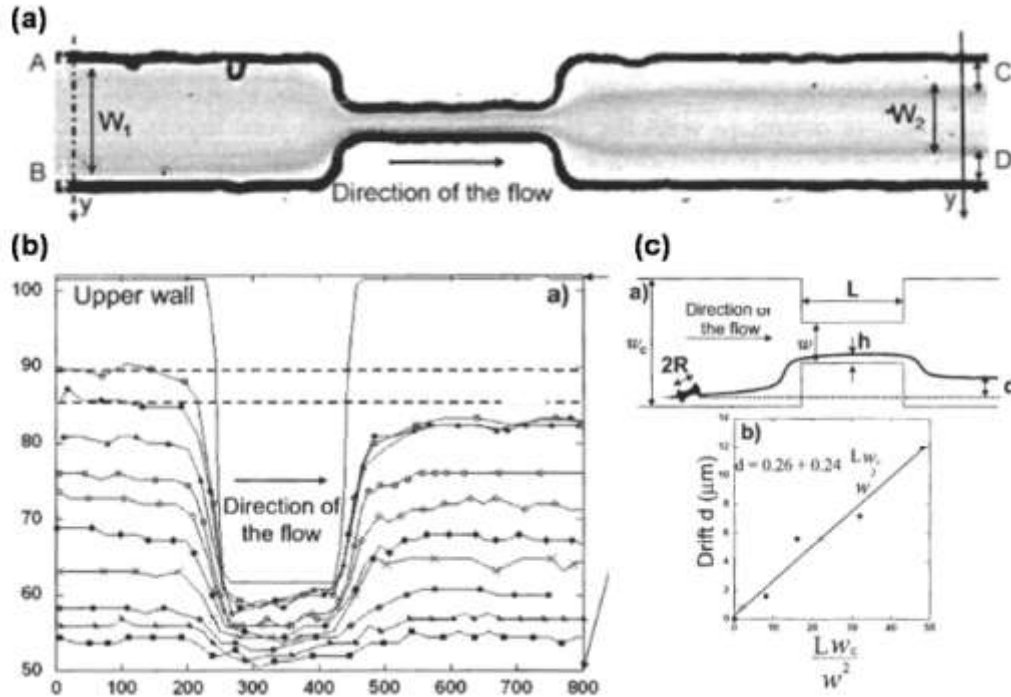


Figure VI.7 : Effet restriction et augmentation de la couche appauvrie, extraits de [FAI 06]. (a) Exemple d'effet restriction obtenu, avec A, B et C, D les couches appauvries en amont et en aval d'une restriction de 200 par 25µm, W1 et W2 les largeurs des répartitions cellulaires. (b) Trajectoires du centre de masse de quelques GR sains injectés à 50µL/h, c'est-à-dire 0,83µL/min. (c) Définition des paramètres géométriques nécessaires à la formulation de la déviation d d'un GR.

De façon plus précise, les GR initialement les plus proches de la paroi du canal s'alignent sur la même ligne de flux en sortie de restriction, tandis que les cellules positionnées plus près du centre du canal en amont de la restriction restent sur leur trajectoire initiale (Figure VI.7.b). Une expression de cette déviation d des GR, suite à leur passage dans la restriction où le cisaillement est plus élevé, a été proposée sur la base du modèle d'Olla [OLL 97]. Cette expression est définie par l'Equation (VI-4),

$$d \approx 6\kappa \frac{LR^3}{wh^2} \quad (\text{VI-4})$$

avec L et w les longueur et largeur de la restriction, w_C la largeur du canal amont, R le rayon de la cellule, κ un paramètre adimensionnel égal à 0,45 et h la distance de la particule à la paroi de la constriction (Figure VI.7.c). Cette loi a été validée expérimentalement dans [FAI 06] puis complétée d'une loi empirique définie par l'Equation (VI-5).

$$d = 0,26 + 0,24 \cdot \frac{Lw_C}{w^2} \quad (\text{VI-5})$$

L'effet restriction a été décrit dans les travaux de Faivre et col. et l'influence de certains paramètres expérimentaux a été étudiée, comme par exemple le débit d'injection, les dimensions de la restriction, la viscosité du liquide de suspension ou encore la déformabilité des GR. Cependant le phénomène observé, qui s'avère très complexe, n'est pas expliqué. Un début d'explication combinant deux hypothèses est proposé ici :

(i) Lors de son passage dans la restriction géométrique, le GR subit une déformation de sa membrane et de son cytosquelette. A la sortie de la restriction, le temps de relaxation du cytosquelette suite à cette déformation est supérieur à celui du temps de transit du GR dans le canal : le GR ne retrouve pas la forme qu'il avait en amont de la restriction. Cette hypothèse s'appuie sur les travaux de T.M. Fisher [FIS 04], dans lesquels l'effet mémoire des GR est mis en évidence dans une configuration expérimentale différente. Un GR est placé dans un écoulement cisailé : il se déforme suite à ce cisaillement mais, une fois la contrainte supprimée, il retrouve sa forme initiale au bout d'un temps de relaxation supérieur à 80min.

(ii) Il est clair que les différentes forces de portance qui s'appliquent sur un GR dépendent de la forme de celui-ci et que, comme expliqué dans la première section de ce chapitre, la force de répulsion qu'exerce la paroi croît pour un GR plus aplati.

Il faudrait valider ces deux hypothèses, à la fois par la théorie et l'expérience. Ce dernier point a été abordé par Faivre et col. qui ont certes montré que l'épaisseur de la couche appauvrie mesurée 1cm après la restriction était semblable à celle mesurée à 500 μ m. Mais il faudrait réitérer cette mesure à des « longueurs après restriction » bien supérieures.

C.2. Effet restriction et fractionnement sanguin

En augmentant les dimensions de la couche appauvrie, l'effet restriction permet de faciliter l'extraction microfluidique du plasma qui y est contenu. En généralisant l'Equation (VI-5) de la déviation d'un GR, on peut approximer de façon grossière l'expansion ε de la couche appauvrie. En l'appliquant à notre géométrie représentée Figure VI.8.a ($L=500\mu$ m, $w_C=200\mu$ m et $w=50\mu$ m), on trouve une expansion ε_{cal} de 9,86 μ m pour une expansion expérimentale ε_{exp} de 9 μ m mesurée sur la Figure VI.8.b. Ces deux valeurs sont cohérentes. La différence peut s'expliquer par le fait que la couche appauvrie en amont a déjà été amplifiée par un effet restriction dû au diamètre interne des capillaires (100 μ m) entrant dans le PDMS. Ce point sera discuté davantage par la suite dans les Chapitres 8 et 12.

Ce principe d'augmentation de la couche appauvrie avant son extraction est utilisé dans [FAI 06] mais également, plus récemment, par Kersaudy-Kerhoas et col. dans [KER 09]. Ces deux dispositifs sont présentés dans les Figure VI.8.c et d.

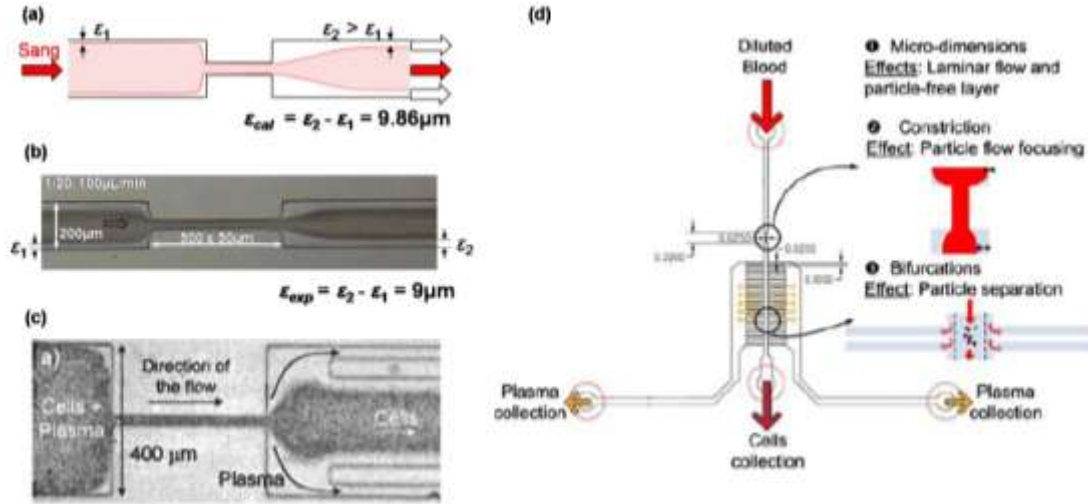


Figure VI.8 : Effet restriction et augmentation de la couche appauvrie pour l'extraction microfluidique du plasma. (a) Vue schématique. (b) Photographie d'un échantillon de sang 1:20 injecté à 100 µL/min. (c) Dispositif proposé par Faivre et col. dans [FAI 06]. (d) Dispositif proposé par Kersaudy et col. dans [KER 09].

Considérons maintenant quelques paramètres expérimentaux dont il serait intéressant de connaître l'influence en vue de réaliser l'extraction du plasma à nos débits d'injection et à partir de sang complet dilué. L'ensemble de ces expériences s'appuie sur les travaux de Faivre et col. mais rappelons cependant qu'une différence essentielle entre leurs travaux et les nôtres concerne la nature de l'échantillon considéré. En effet, dans [FAI 06], les injections sont uniquement constituées de GR en suspension dans une solution de Dextran tandis que dans notre cas, il s'agit directement d'un échantillon de sang complet dilué au PBS.

Par ailleurs, en vue de l'extraction du plasma, nous nous intéresserons à la largeur de la couche appauvrie en aval ($D_{aval} = \varepsilon_2 + \varepsilon_2'$) ou au ratio d'expansion de la couche appauvrie D_{aval}/D_{amont} et non pas au ratio W_2/W_1 défini dans la Figure VI.7.

C.2.1. Effet restriction et particules considérées

Les premières expériences ont pour but d'évaluer l'influence de cet effet selon le type de particules ou cellules considérées. En effet, Faivre et col. ont montré que cet effet était observable sur les GR, déformables et ellipsoïdes, et non sur les billes, rigides et sphériques. Cette différence de comportement selon la particule considérée est un point qu'il serait intéressant de vérifier et développer davantage, afin par exemple d'évaluer la faisabilité d'un tri cellulaire fondé sur ce principe fluidique.

Pour cela, des injections de billes fluorescentes, de GR sains et de GR lysés ont été réalisées à un débit identique de 50 µL/min, dans un même motif, caractérisé par une restriction telle que $L=500\mu\text{m}$ et $w=50\mu\text{m}$. Les résultats sont présentés dans la Figure VI.9.

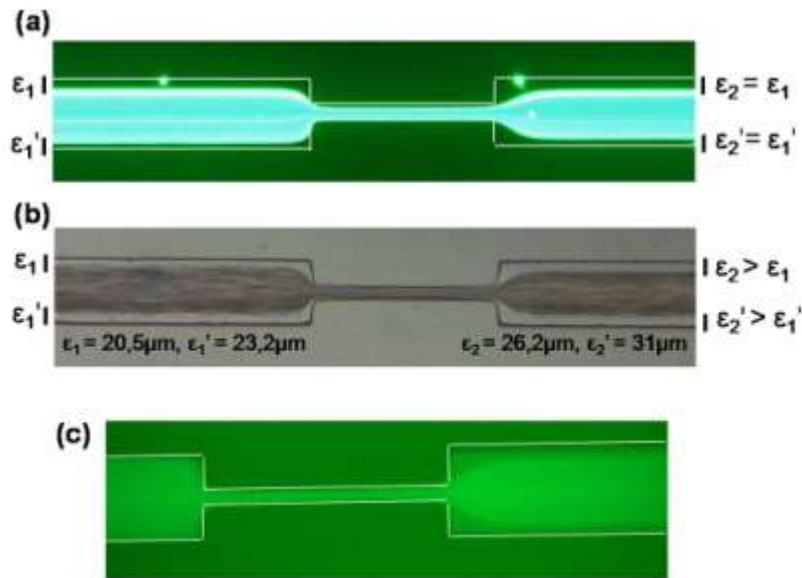


Figure VI.9 : Effet restriction et nature des particules injectées, pour des injections identiques à 50µL/min. (a) Billes fluorescentes de 5µm. (b) Sang dilué au 1:20 avec du PBS. (c) Sang lysé selon le protocole Roche défini dans le Chapitre 2 ainsi qu'en Annexe 1.

- Dans la Figure VI.9.a, les billes fluorescentes de 5µm ne subissent pas d'effet restriction. Ce résultat est conforme à celui annoncé par M. Faivre et col.
- De même la Figure VI.9.b illustre une nouvelle fois l'effet restriction observé sur un échantillon de sang dilué.
- La Figure VI.9.c représente une injection de sang lysé à l'aide du protocole Roche, comme expliqué en Annexe 1. Sous l'effet du choc osmotique, les GR ouvrent un ou des pores de leur membrane, échangent leur contenu avec le milieu et referment leur membrane. Afin de visualiser les fantômes de GR (s'il n'y a plus d'hémoglobine, il n'y a plus de contraste), les membranes ont été marquées en fluorescence avec du CD235a-FITC anti GR. La visualisation évidente d'un effet restriction (cependant difficilement quantifiable ici) valide l'importance de la membrane du GR et de sa déformation dans l'effet restriction. Par ailleurs dans le cas où les GB, plus gros, sphériques et rigides que les GR se comportent comme des billes, il serait envisageable d'extraire les GB à partir d'une suspension de sang lysé en utilisant cette différence de comportement au voisinage des parois.

Des injections ont également été réalisées à partir de solutions enrichies en GB ou en PLT mais n'ont pas permis d'obtenir des résultats concluants. L'explication principale est la difficulté de leur visualisation à nos débits, comme expliqué dans le Chapitre 4.

C.2.2. Effet restriction et influence du débit

M. Faivre et col. ont montré que, pour des débits de 0,16 à 16µL/min, le débit ne semblait pas avoir d'influence sur l'effet restriction. Nous avons vérifié ce point sur une gamme plus étendue de débits, c'est-à-dire de 10 à 200µL/min. La Figure VI.10 représente les résultats obtenus pour une injection de sang dilué au 1:20.

Ces résultats confirment que, même en étendant la gamme de débits considérés jusque 200µL/min, il n'y a pas d'effet notable du débit d'injection sur l'effet restriction.

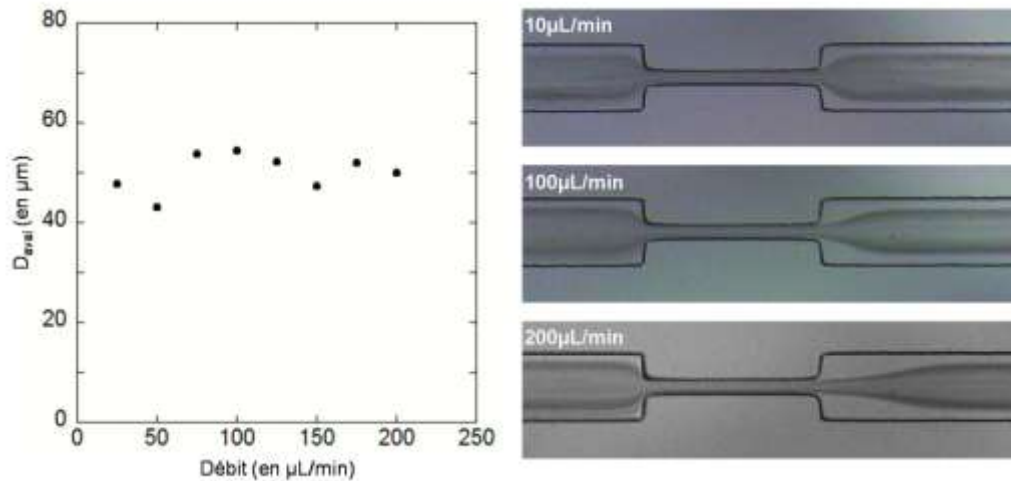


Figure VI.10 : Effet restriction et influence du débit d'injection, de 10 à 200 $\mu\text{L}/\text{min}$.

C.2.3. Effet restriction et paramètres géométriques

La Figure VI.11 recense l'influence de deux paramètres géométriques sur l'épaisseur de la couche appauvrie, à savoir la largeur en aval et la longueur de la restriction.

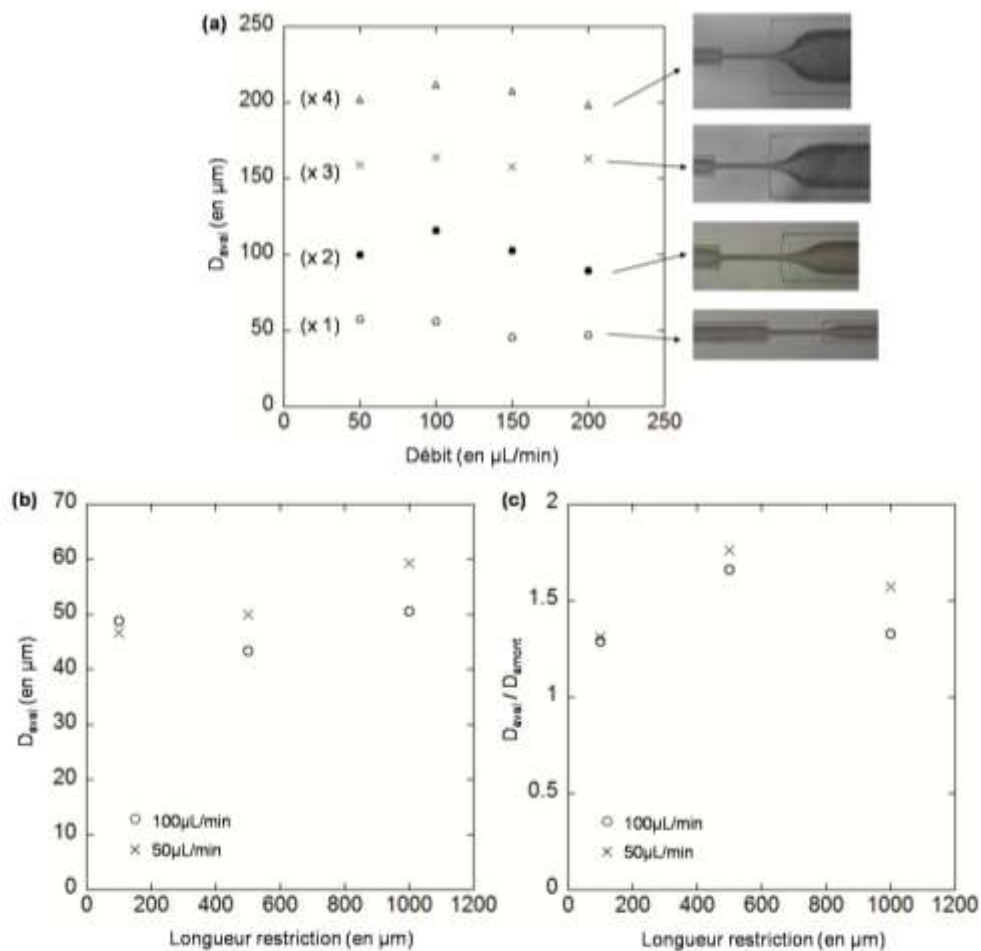


Figure VI.11 : Effet restriction et influence de paramètres géométriques tels que (a) la largeur du canal en aval de la restriction et (b, c) la longueur de la restriction.

Différentes largeurs en aval de la restriction ont été essayées et comparées dans la Figure VI.11.a, avec des expansions géométriques de facteur de 1, 2, 3 et 4. Comme attendu, on retrouve une augmentation de la couche appauvrie proportionnelle au facteur géométrique d'expansion ; au fur et à mesure qu'on élargit le canal, on dilate en quelque sorte le profil de répartition en aval et donc la couche appauvrie. Cette augmentation de la couche claire peut en faciliter l'extraction par des microcanaux latéraux. C'est pourquoi ce point est important pour la suite.

De même, trois longueurs de restriction ont été comparées à 100 $\mu\text{L}/\text{min}$: 100, 500 et 1000 μm , dont les résultats sont récapitulés dans les Figure VI.11.b et c. M. Faivre et col ont mis en évidence dans leurs travaux l'influence de cette longueur sur l'amplitude de l'effet restriction ; plus la restriction est longue, plus le cisaillement est appliqué longtemps et plus importante est la déviation du GR. On ne retrouve pas ces résultats à l'identique ici puisque l'amplitude de la couche appauvrie n'est pas linéairement croissante avec la longueur de la restriction (Figure VI.11.b). Il semble même que 500 μm soit une longueur optimale, avec le meilleur rapport d'expansion (Figure VI.11.c), ce qui explique que cette longueur sera celle utilisée par la suite. Ces différences peuvent s'expliquer encore une fois par le packaging utilisé dans ces dispositifs : le capillaire d'entrée dans la puce constitue une restriction importante (efficace car longue et fine), ce qui apporte un biais loin d'être négligeable ici.

C.2.4. Effet restriction et influence de l'hématocrite

Le but final de ce travail étant d'extraire du plasma à partir d'un échantillon de sang le moins dilué possible, il est également important de quantifier l'influence de la dilution sur l'effet restriction. Pour cela, des échantillons sanguins aux dilutions variant de 1:50 (0,02) à 1:2 (0,05) sont injectés dans des motifs identiques à 100 et 200 $\mu\text{L}/\text{min}$. La Figure VI.12 illustre les résultats obtenus.

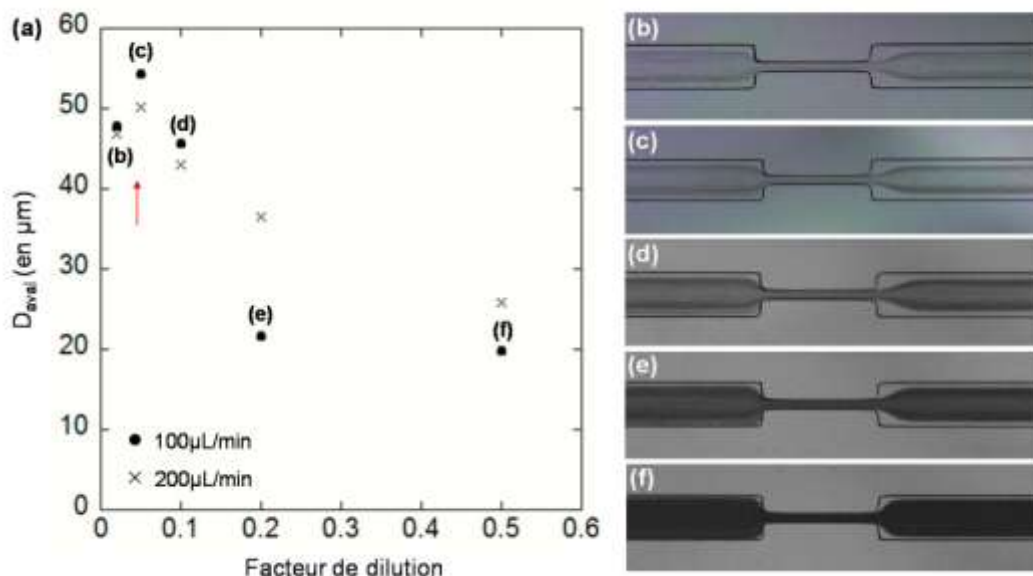


Figure VI.12 : Effet restriction et influence de la dilution. Comparaison des couches appauvries mesurées en aval de la restriction, pour des dilutions de 1:50 à 1:2, injectées à 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. La flèche rouge indique le point d'inflexion.

- Il semble que, pour les dilutions les plus faibles ($< 1:20=0,05$) la couche appauvrie diminue lorsque la dilution augmente ou, de façon équivalente, l'effet restriction augmente avec la concentration en GR. On retrouve ici les résultats de Faivre et col. sur l'effet de l'hématocrite : l'effet restriction était amplifié entre les hématocrites 0,1% et 2,6%, soit en équivalents dilution de 1:500 (0,002) à 1:20 (0,05).

Ce résultat est expliqué dans [FAI 06] comme suit : lorsque la concentration en GR augmente, le rapport des viscosités du fluide interne et du fluide porteur augmente également. Il en résulte que, comme expliqué dans la première section, la force de portance exercée par la paroi est supérieure et la couche appauvrie est alors accentuée.

- La courbe obtenue présente une inflexion (indiquée par la flèche rouge) vers la dilution 1:20 (0,05), à partir de laquelle l'effet restriction diminue avec l'augmentation de la concentration en GR. Puis, à partir de la dilution 1:5, la couche appauvrie devient d'une épaisseur très faible et se stabilise. A la dilution 1:2 (0,5), il n'est plus possible de mesurer la couche appauvrie en amont de la restriction (Figure VI.12.f).

Cette gamme de dilutions n'a pas été traitée dans [FAI 06]. Cette décroissance, à partir d'une concentration critique, de l'effet restriction avec la concentration de l'échantillon en GR peut s'expliquer par un effet collectif : il y a tout simplement trop de GR pour permettre un profil de migration latérale plus accentué.

Pour la suite, on se placera donc à des dilutions de 1:20 ou 1:10.

D. Conclusion et perspectives

Ainsi, différents phénomènes ont été proposés ici pour permettre d'épaissir la couche claire initialement présente dans un canal. Leur couplage permettrait probablement d'augmenter davantage la région occupée par le seul plasma et de permettre son extraction. Ce couplage est illustré Figure VI.13.

Récapitulons ici les étapes essentielles de ce couplage. Tout d'abord il résulte de la migration latérale des GR la formation d'une couche appauvrie au voisinage des parois (❶). La restriction du canal augmente le taux de cisaillement appliqué aux GR et augmente la couche appauvrie en aval de la restriction (❷). Cette couche appauvrie alimente la singularité géométrique, ici les coins d'un élargissement, où des recirculations apparaissent pour des débits plus élevés (❸). Le couplage de la restriction et de l'élargissement permet d'augmenter le coefficient d'expansion de la singularité, c'est-à-dire de diminuer le débit d'apparition des vortex de Moffatt, comme on peut le voir sur la Figure VI.13.

La localisation du prélèvement du plasma est un point crucial car l'extraction ne doit pas déstabiliser ou atténuer la recirculation. Un pompage trop fort ou mal placé pourrait plaquer l'écoulement à la paroi et tuer la recirculation. L'idée principale est de ne prélever le plasma qu'avec un faible taux d'extraction, afin de ne pas perturber l'écoulement, et de privilégier plusieurs points d'extraction pour un rendement final plus élevé. Dans cette perspective, la géométrie doit être symétrique, afin que les recirculations soient exploitées de part et d'autre du canal. Il faut également pouvoir contrôler le début de l'extraction afin d'extraire le plasma lorsque la recirculation est stabilisée. En pratique, cet aspect ne sera pas considéré pour l'instant mais sera à prendre en compte par la suite.

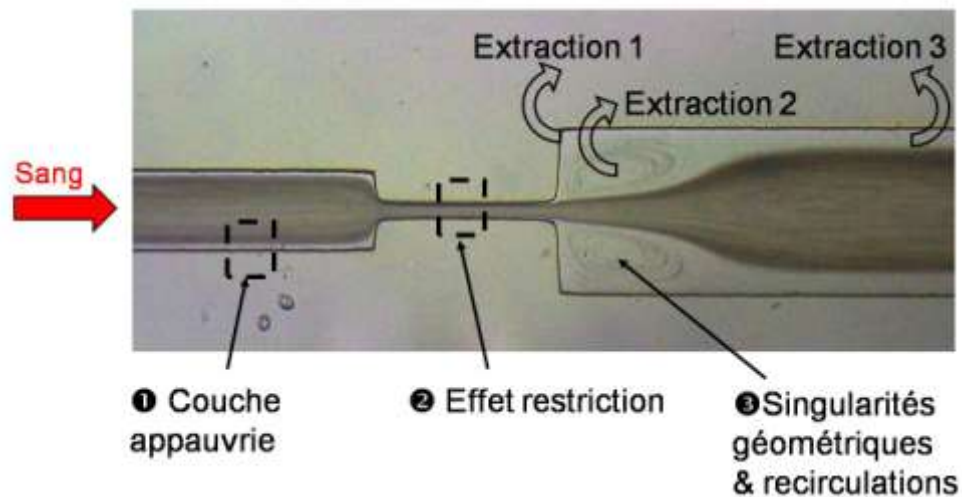


Figure VI.13 : Couplage de différents effets microfluidiques en vue de l'extraction du plasma.

Compte-tenu de ces considérations, le couplage de différents effets fluidiques précédents permet d'envisager différents lieux d'extraction. Trois possibilités s'offrent à nous, indiquées dans la Figure VI.13. Dans le cas d'une recirculation produite dans un élargissement brusque du canal, la première possibilité est l'extraction dans les coins de l'élargissement, de façon tangentielle à la paroi du canal et de préférence en arrière de l'écoulement pour ne pas le perturber (Extraction 1). On peut également prélever le plasma au centre des anneaux concentriques ainsi produits, là où la séparation est la plus efficace (Extraction 2). Dans ce dernier cas, l'extraction est plus complexe car le canal d'extraction doit être perpendiculaire au plan de l'injection mais également parce que le centre des anneaux voit sa position évoluer avec le débit. Enfin, la dernière possibilité (Extraction 3) est l'extraction de la couche appauvrie stabilisée mais accentuée par l'effet restriction, comme proposé par Faivre et col. dans [FAI 06] ou Kersaudy-Kerhoas et col. dans [KER 09].

L'exploitation de ces différents principes et de leur couplage en vue de l'extraction du plasma sera abordée dans le Chapitre 8.

VII. Premiers dispositifs et canaux coudés

Différents principes de microfluidique passive ont été évalués dans le Chapitre 5, par l'intermédiaire de tests expérimentaux menés sur des dispositifs existants fondés sur ces principes. Cette phase de prise en main expérimentale a permis de nous familiariser avec certains phénomènes, tels que la migration latérale et les écoulements de Dean, que nous avons jugé prometteurs pour imaginer de nouveaux dispositifs. Dans cette perspective, ce Chapitre 7 décrit deux configurations d'écoulement caractérisées par un canal coudé (dispositifs *Epingle à Cheveux* et *Coude en U*). Les dispositifs qui en résultent constituent nos premières tentatives originales en vue de la séparation particules / liquide d'une suspension.

A. Dispositif Epingle à cheveux

A.1. Principe

Le dispositif imaginé est représenté Figure VII.1. Le canal d'entrée se réduit sur un demi-coude large de $30\mu\text{m}$. En sortie de ce coude, les cellules et le plasma peuvent ensuite s'écouler de manière laminaire, sans se re-mélanger, dans une chambre qui s'élargit et se divise en deux sorties.

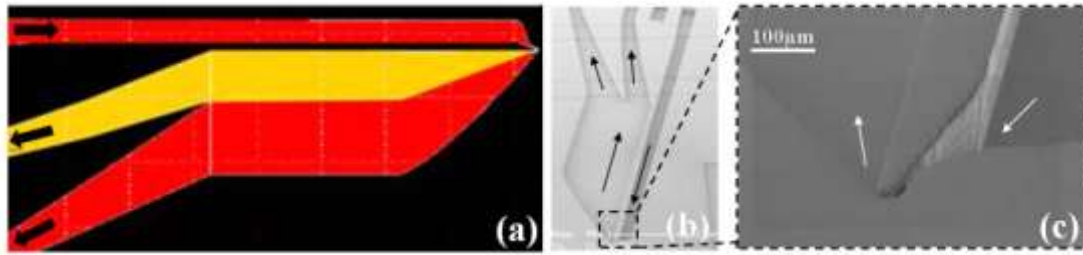


Figure VII.1 : Dispositif *Epingle à cheveux*. (a) Schéma. (b, c) Photographies MEB.

L'objectif de ce dispositif était le suivant : augmenter la force centrifuge exercée sur les billes en jouant sur les deux paramètres vitesse du fluide et rayon de courbure. En effet, au vu de l'équation (VII-1), augmenter U_P et réduire R_C permet d'augmenter F_C .

$$F_C = m \frac{U_P^2}{R_C} \quad (\text{VII-1})$$

Dans ce but, le rayon de courbure interne est choisi à $30\mu\text{m}$ ce qui, pour $U_P=1\text{m/sec}$, équivaut à une accélération de $0,02\mu\text{m}^2/\text{sec}$ au lieu de $0,004\mu\text{m}^2/\text{sec}$ pour un rayon de courbure de $200\mu\text{m}$ (à largeur de canal égale). Par ailleurs, la réduction de la largeur de canal au niveau du coude permet une très forte augmentation de la vitesse d'écoulement du liquide dans le coude. Ainsi, pour un débit de $100\mu\text{L/min}$, la vitesse égale à $4,1.10^4\mu\text{m/sec}$ dans le canal initial de $200\mu\text{m}$ passe à $3,7.10^5\mu\text{m/sec}$ dans le coude.

Ce dispositif n'est qu'un premier prototype, fabriqué afin d'analyser la faisabilité du principe. Les expériences qui ont été menées ne sont donc que préliminaires : il n'y a pas d'information quantitative et l'analyse des résultats se fera par conséquent de manière visuelle.

A.2. Résultats

Les expériences ont été réalisées avec des billes de 5 μ m diluées dans du PBS, puis avec du sang dilué 1:10. Les différents résultats obtenus sont présentés de manière synthétique dans la Figure VII.2.

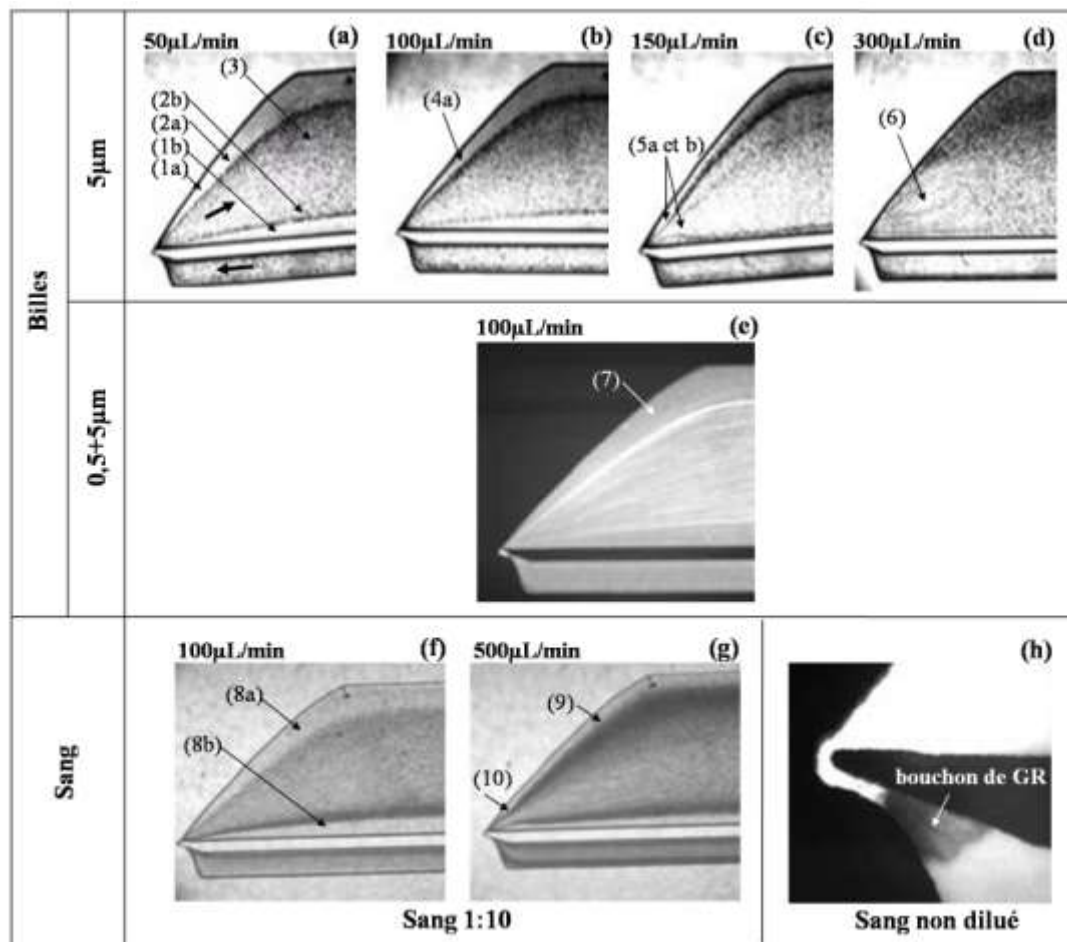


Figure VII.2 : Evolution de l'écoulement obtenu dans un canal fin coudé en fonction du débit. (a, b, c, d) Injection de billes fluorescentes de 5 μ m, observées en fond noir. (e) Injection d'un mélange de billes de 0,5 et 5 μ m, observées en fluorescence. (f, g) Injection de sang dilué 1:10. (h) Injection de sang non dilué et visualisation d'un bouchon de GR à l'entrée du coude.

✓ Les injections de billes de 5 μ m donnent les résultats suivants :

- A faible débit (de 10 à 50 μ L/min, Figure VII.2.a), la répartition des particules illustre le phénomène de migration latérale hétérogène présenté précédemment dans le Chapitre 6. Une zone sans particules apparaît au niveau des parois (1a et 1b), suivie ensuite d'un cordon de surconcentration (2a et 2b) puis d'une zone centrale de concentration homogène (3).

- A plus grand débit (à partir de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$, Figure VII.2.b), le cordon de surconcentration s'épaissit sur son côté extérieur (4a). Les effets de centrifugation s'y additionnent alors au phénomène de migration latérale. Ces premiers effets s'amplifient avec l'augmentation du débit.

- A partir de 150 $\mu\text{L}/\text{min}$ (Figure VII.2.c), deux zones décollées en sortie du coude apparaissent dans les couches claires par suite du fort gradient de pression adverse. Les tourbillons associés à ces zones décollées (recirculations) sont tout d'abord petits (5a et 5b) et répartis symétriquement autour de la zone centrale qui véhicule tout le flux de particules. Cette zone occupée se trouve pincée par les deux tourbillons et forme une sorte de jet. Puis les recirculations prennent de l'ampleur avec le débit et les frontières couches claires / zone centrale s'évanouissent. Les tourbillons coalescent pour ne former qu'un gros vortex (6) occupant tout l'espace de la chambre (à 300 $\mu\text{L}/\text{min}$, Figure VII.2.d) et re-mélangeant les particules.

✓ Des injections similaires ont été réalisées à l'aide d'un mélange constitué de la solution précédente ajoutée de billes de 0,5 μm . La Figure VII.2.e illustre le résultat obtenu pour une injection de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. Tandis que les billes de 5 μm subissent la même répartition que précédemment, les billes de 0,5 μm , elles, paraissent beaucoup moins sensibles à la migration latérale et à la centrifugation ; elles forment comme un fond uniforme (7). Ce résultat montre qu'une ségrégation selon la taille de la particule est envisageable par cette méthode.

✓ Les phénomènes précédents ont été observés de façon similaire pour des injections de sang dilué 1:10. En effet, à faibles débits, la migration latérale hétérogène apparaît également pour les GR dilués, mettant en évidence au niveau des parois une zone appauvrie en GR (8a et 8b) (Figure VII.2.f). A partir de 200 $\mu\text{L}/\text{min}$, la force centrifuge se manifeste (9). Enfin, aux alentours de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$, les tourbillons associés aux zones décollées apparaissent (10) mais avec une expansion réduite comparée à celle obtenue pour les billes (Figure VII.2.g).

✓ Une injection a également été faite avec du sang non dilué. Une migration latérale est visible, ainsi que des recirculations en sortie de l'*Epingle à cheveux*. Malheureusement le système se colmate très rapidement en amont du coude (Figure VII.2.h) et illustre la limite principale de ce prototype : le coude est trop fin (30 μm = 3 à 4 GR) pour un échantillon sanguin trop dense et trop visqueux.

A.3. Conclusion

Ce dispositif *Epingle à Cheveux* permet de visualiser de nombreux phénomènes intéressants relatifs aux écoulements de particules dans une restriction de canal coudé : la couche claire (i) résultant de la migration latérale (et de la répulsion de la paroi), fortement accentuée par la restriction géométrique du canal (ii) et progressivement dilatée par la divergence en aval de la restriction (iii). Lorsque le débit augmente, l'effet centrifuge attendu par la présence du coude (iv) augmente la surconcentration dans le cordon externe puis des recirculations (v) se manifestent dans la sortie de la restriction.

Ce dispositif a l'avantage de présenter des phénomènes semblables, de façon plus ou moins marquée, sur des injections de billes et de sang. Par ailleurs, une ségrégation

paraît envisageable dans le cas d'un mélange de billes, les plus petites étant moins sensibles aux phénomènes décrits précédemment que les billes les plus grosses.

Le principe que nous avons développé ultérieurement apparaît en partie comme une version simplifiée de ce dispositif *Epingle à Cheveux*, dans lequel la courbure de la restriction a été abandonnée ainsi que la divergence du canal en aval de la restriction.

B. Dispositifs Coude en U

B.1. Dispositif S et principe

Dispositif

Ce dispositif *S*, schématisé dans la Figure VII.3 et initialement fabriqué pour l'étude de la force centrifuge, comporte un canal d'entrée rectiligne (E) qui se prolonge ensuite en $\frac{1}{2}$ coude et à l'issue duquel il se sépare en deux canaux de sortie (S_1 et S_0).



Figure VII.3 : Schéma du dispositif *S*. Le premier demi-coude est large de $200\mu\text{m}$ avec un rayon de courbure de 200 à $400\mu\text{m}$.

Description du principe

Le principe proposé avec ce dispositif et schématisé Figure VII.4, est d'exploiter le couplage original entre deux effets connus : d'une part, la migration latérale des particules dans un canal rectiligne (Chapitre 6) et la formation à une distance donnée de la paroi d'un anneau surconcentré et, d'autre part, l'apparition d'écoulements secondaires appelés écoulements de Dean (Chapitre 5) dans un canal coudé.

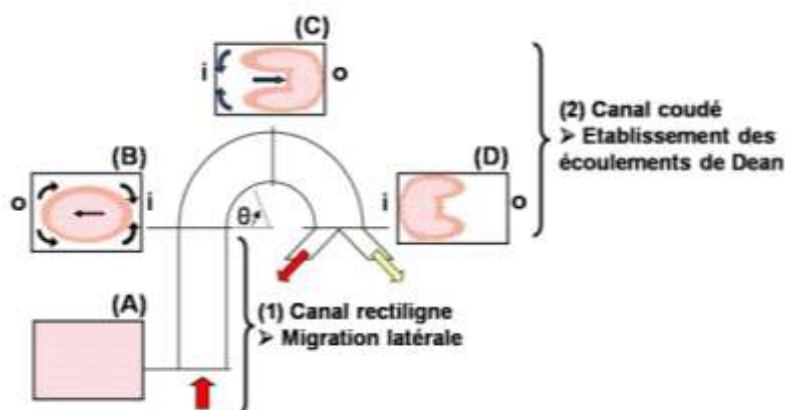


Figure VII.4 : Schéma du principe proposé, fondé sur le couplage original entre la migration latérale et l'établissement des écoulements de Dean, d'après [ACH 08.2].

(1) Comme expliqué dans le Chapitre 6, lorsque des GR s'écoulent dans un canal rectiligne ils subissent des forces de portance qui tendent à les éloigner de la paroi. Au bout d'une certaine longueur d'écoulement, la distribution initialement homogène (A) comporte une zone sans particule près des parois, un anneau dans lequel les GR sont surconcentrés puis une zone centrale de concentration relativement homogène et inférieure à celle dans l'anneau (B).

(2) Les écoulements de Dean déforment ensuite l'anneau surconcentré. La Figure VII.4 montre cette évolution entre le début du coude (B), son milieu (C) et sa partie terminale (D). Lorsque les conditions de l'écoulement sont choisies de manière adéquate, les GR qui constituaient initialement l'anneau surconcentré en (B) se trouvent rassemblés du côté intérieur (i) de la courbure à la fin du demi-coude (D). En pratique, une bifurcation peut donc être placée à la fin du demi-coude et le débit d'injection (par conséquent le nombre de Dean équivalent) contrôlé de manière à n'engendrer qu'une demi-boucle. En sortie de ce demi-coude, les particules concentrées en (i) peuvent être récupérées dans le canal d'extraction correspondant.

Tout cela suppose un contrôle fin des écoulements secondaires dans le canal coudé. Si les vortex de Dean ne sont pas assez développés, la séparation ne se produit pas. Tandis que des vortex trop développés tendent à mélanger à nouveau les fractions enrichies en plasma et en GR après les avoir séparées.

Ce principe se distingue tout particulièrement de l'art antérieur, où l'effet de ces vortex est considéré comme défavorable. La démarche traditionnelle tend à privilégier la force centrifuge au détriment de la force visqueuse d'entraînement des GR dans les vortex de Dean. C'est le contraire ici, où la force visqueuse est rendue dominante par rapport à la force centrifuge. Par ailleurs, le débit d'injection est choisi afin que les vortex de Dean provoquent un effet global centripète, contrairement aux procédés de centrifugation où la surconcentration est extraite du côté extérieur du coude. Ce procédé a un potentiel supérieur à celui de l'approche traditionnelle, notamment dans notre cas où la suspension à séparer est le sang. En effet, les GR sont petits avec une masse volumique voisine de celle du plasma ; ces conditions ne favorisent pas la séparation par centrifugation.

Illustration avec des billes de 3µm

Afin d'illustrer ce principe, une suspension de billes de 3µm est injectée dans le dispositif *S* décrit précédemment, avec des débits variant de 10 à 300µL/min. Les résultats de cette expérience sont présentés dans la Figure VII.5.a et schématisés dans la Figure VII.5.b :

- A 10µL/min (configuration A), la distribution initiale est conservée par la conduite coudée. L'accélération centrifuge est faible ($C_I/C_O \approx 1$, $a_c = 0,04-0,08 \text{ m/s}^2$, $De < 1$) ; les billes suivent la trajectoire du fluide.
- A 150µL/min (configuration B), les vortex de Dean sont présents (on a $De > 9$) et entraînent les billes sur un cycle ; les billes de 3µm sont envoyées vers la paroi intérieure du canal ($C_I/C_O = 2,66$).
- A 300µL/min (configuration C), les vortex de Dean sont trop développés ($De > 18$) et tendent à mélanger à nouveau les deux fractions liquide/billes ($C_I/C_O = 1,73$).

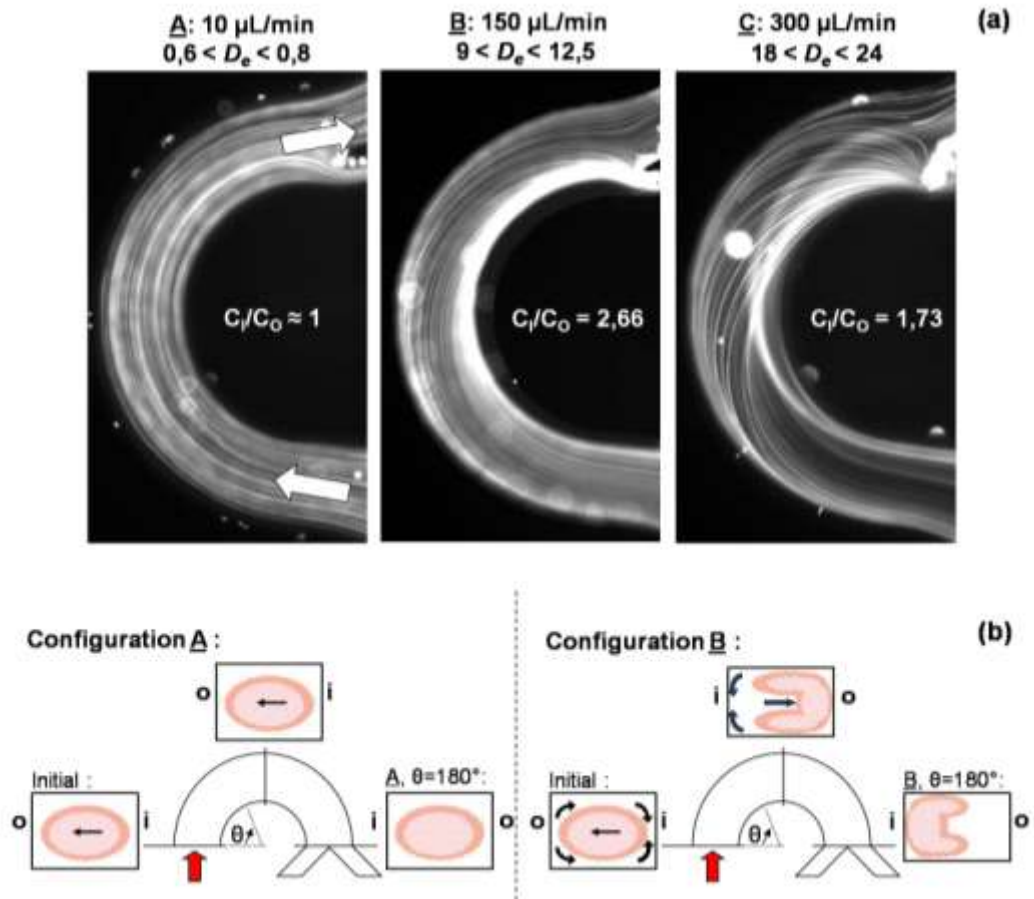


Figure VII.5 : Dispositif *S* et résultats. (a) Résultats obtenus pour une injection de billes fluorescentes de 3µm, injectées avec des débits de 10 à 300µL/min. (b) Schématisation de la distribution obtenue dans des sections placées à différents endroits du coude.

Ces résultats semblent valider le principe proposé et donnent un enrichissement maximal d'un facteur 2,66 à 150µL/min. Remarquons qu'il est important que le canal coudé soit ouvert d'un angle de 180° afin que les écoulements de Dean aient une longueur suffisante pour s'établir aux débits considérés.

Cas des cellules sanguines

Ce mouvement centripète a été observé lors d'expériences préliminaires menées à partir d'une injection de sang 1:20 dans le dispositif *S*. Cependant aucune donnée quantitative n'est disponible concernant la distribution des GR dans les deux canaux de sortie ; l'angle de la jonction entre ces deux canaux est trop marqué et la pointe qui en résulte provoque une hémolyse rapide et importante des GR.

Ce principe semble donc applicable au cas des cellules sanguines mais la géométrie d'extraction doit être optimisée, entre autre avec une jonction arrondie. Par ailleurs, une exploitation efficace de ce principe pour l'extraction du plasma semble nécessiter une dilution importante de l'échantillon, comme l'illustre la dilution à 2% utilisée par Di Carlo et col. [DIC 07].

Pour améliorer la séparation GR/plasma, il serait surtout intéressant d'exploiter l'effet restriction expliqué précédemment dans le Chapitre 6. Une restriction géométrique du canal rectiligne permettrait d'accentuer la surconcentration des GR au niveau de l'anneau, et ainsi d'améliorer les conditions initiales à l'entrée du demi-coude, pour augmenter davantage le rendement de séparation à sa sortie.

B.2. Autres dispositifs de coudes en U et résultats préliminaires

A partir des résultats précédents, des nouvelles puces en silicium ont été fabriquées et ont fait l'objet de premières expérimentations. La géométrie des puces *Coude U1* et *Coude U2* est décrite dans la Figure VII.6. Chacune de ces deux puces comprend un canal d'entrée rectiligne (E) qui se poursuit en demi-coude puis se sépare en deux canaux de sortie (S_I et S_O) par une bifurcation arrondie. *Coude U2* diffère de *Coude U1* par l'ajout d'une restriction géométrique au canal rectiligne et qui s'ouvre sur la partie coudée

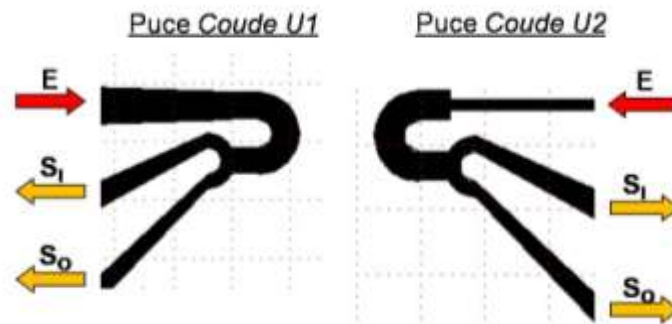


Figure VII.6 : Schéma des dispositifs *Coude U1* et *Coude U2*. Les deux motifs comprennent une section coudée identique, de largeur 200 μ m et de rayon de courbure compris entre 100 et 300 μ m, mais diffèrent par leur partie rectiligne, large de 200 μ m pour *Coude U1* et de 50 μ m pour *Coude U2*. La bifurcation est arrondie, avec un rayon de courbure de 50 à 150 μ m.

Dans le cadre de la caractérisation de ces dispositifs, trois types de suspensions ont été injectées ; des billes de 3, 5 ou 10 μ m diluées dans du PBS, afin éventuellement de mettre en évidence une différence de comportement fluide pour chaque taille.

Billes de 3 et 5 μ m

Une première série d'expériences a été menée sur des billes de 3 et 5 μ m afin d'évaluer le comportement du système. La répartition des billes dans les deux sorties est représentée en fonction du débit dans la Figure VII.7 pour les deux puces *Coude U1* et *Coude U2*.

Sur le motif *Coude U1*, ces premiers résultats qualitatifs permettent de confirmer la présence des écoulements de Dean pour les deux tailles de billes considérées, et la visualisation d'un effet global centripète (nettement visible sur la Figure VII.7.f). Il est difficile d'estimer de façon fiable, par la seule visualisation, l'effet de la taille de la particule sur le phénomène considéré. Il semble cependant, qu'à débits égaux, les vortex de Dean soient plus intenses pour les billes les plus grosses (Figure VII.7.b et e, Figure VII.7.c et f). Des expériences plus quantitatives seraient nécessaires pour avoir une

représentation plus précise de la répartition des billes en fonction du débit, du nombre de Dean et de la taille des particules.

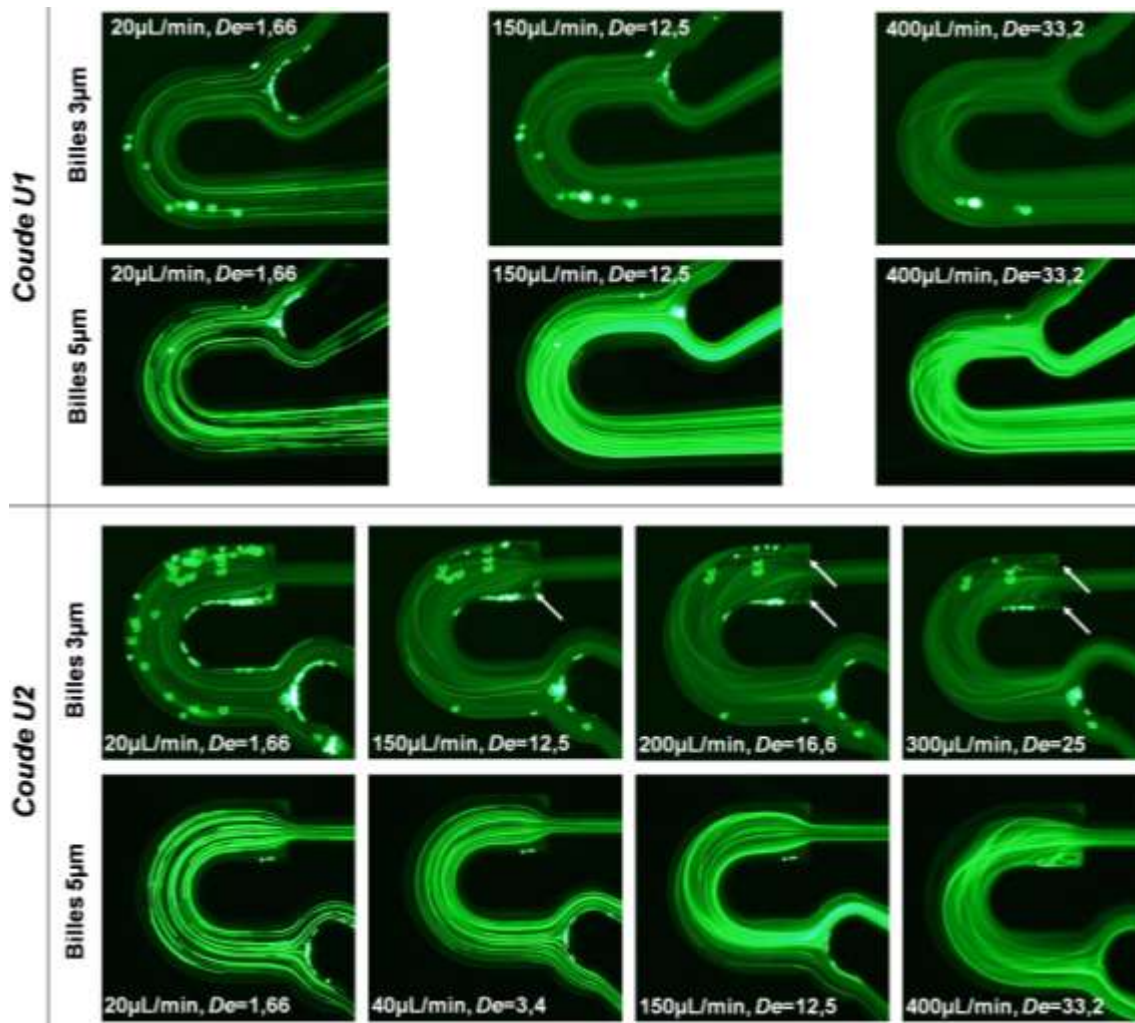


Figure VII.7 : Dispositifs *Coude U* et photographies en fluorescence. Les flèches blanches indiquent la présence de recirculations dans les coins de l'élargissement.

Sur le motif *Coude U2*, les billes n'étant pas censées subir l'effet restriction (Chapitre 6), il était attendu que la répartition des billes dans ce demi-coude soit semblable à celle dans *Coude U1*. En pratique, l'élargissement qui fait suite à la restriction géométrique du canal voit apparaître des recirculations (Figure VII.7.h, i et j), comme abordé précédemment dans le Chapitre 6. Ces recirculations, placées juste à l'entrée du coude, perturbent l'écoulement et ses conditions initiales nécessaires au bon fonctionnement de notre principe. Il faudra donc par la suite modifier cette géométrie en plaçant la restriction davantage en amont du demi-coude, afin d'avoir un profil de migration stabilisé au début du coude. Par ailleurs, il sera nécessaire de tester ce motif *Coude U2* avec des GR dilués, pour voir l'influence de cet effet restriction sur l'écoulement dans le demi-coude, et comme dans le cas des puces *Coude U1*, mener des expériences plus quantitatives sur ces nouveaux dispositifs *Coude U2* afin d'en savoir un peu plus.

Billes de 10 μ m et mise en évidence de problèmes de reproductibilité

Des injections ont également été réalisées sur des billes de 10 μ m, afin de comparer les résultats à ceux obtenus pour les billes de 3 et 5 μ m et de mettre en avant la possibilité de séparer un mélange de billes par ce phénomène. Ces injections sont présentées dans la Figure VII.8 pour le motif *Coude U1*. L'écoulement obtenu n'est pas du tout homogène ; on distingue nettement une trajectoire privilégiée. Le problème se retrouve à l'identique sur le motif *Coude U2* (données non montrées).

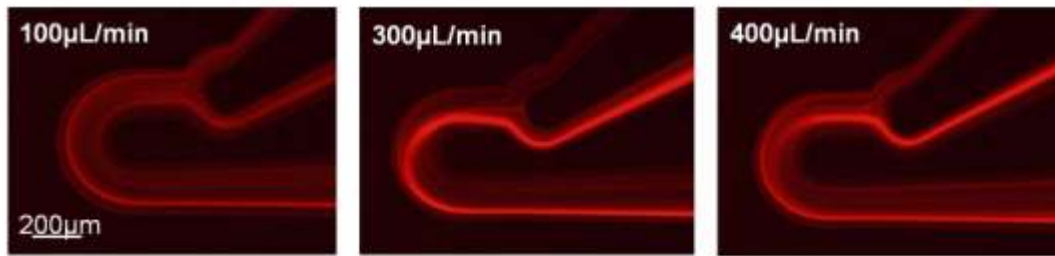


Figure VII.8 : Injections de billes fluorescentes de 10 μ m dans le motif *Coude U1* et mise en évidence d'un écoulement hétérogène.

Afin d'en savoir plus, la même expérience a été reproduite trois fois sur le même dispositif et avec des conditions expérimentales similaires. Les résultats de comptage sont présentés dans le graphique de la Figure VII.9.a. Pour les expériences n°1 et n°2, l'enrichissement maximal obtenu est proche de 10, pour des débits d'injection de 300 et 450 μ L/min respectivement, tandis que dans l'expérience n°3 l'enrichissement maximal est nettement plus faible, d'environ 2,5, et pour un débit de 500 μ L/min. Ces expériences quantitatives mettent donc clairement en évidence le caractère non reproductible de nos résultats, puisque la valeur d'enrichissement maximum et le débit correspondant sont différents dans les trois cas, et confirment la seule visualisation montrée précédemment.

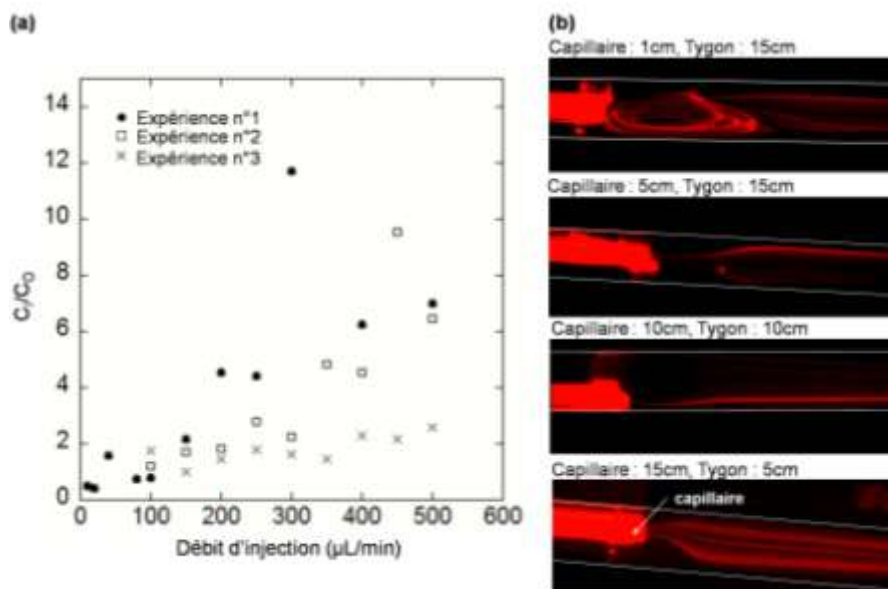


Figure VII.9 : Problèmes de reproductibilité. (a) Trois expériences réalisées sur un dispositif *Coude U1* avec une injection de billes de 10 μ m et dans des conditions expérimentales identiques. (b) Conditions initiales observées pour des injections de billes de 10 μ m, à 500 μ L/min, dans des motifs ayant des connectiques différentes. Ces observations sont réalisées en fluorescence, avec les traits blancs délimitant la largeur du canal.

L'observation des différents clichés révèle que la cause de cette non-reproductibilité dans les résultats obtenus est l'inhomogénéité de l'écoulement dès son entrée dans le dispositif. Or le principe de séparation proposé ici est très fortement dépendant des conditions initiales à l'entrée du demi-coude. Ce problème semble être en grande partie lié au mode de connexion fluide.

Pour vérifier cette hypothèse, différents types de packaging ont été testés avec des longueurs de capillaires variables. Ils sont récapitulés dans la Figure VII.9.b, pour des injections à 500 μ L/min. Quelle que soit la longueur de la connectique utilisée et la résistance fluide correspondante, l'écoulement n'est jamais homogène dans le canal d'entrée. Et pour la longueur de capillaire la plus faible (1cm), des recirculations sont même visualisables en sortie du capillaire.

Deux explications peuvent justifier ce fait :

- ✓ Tout d'abord, comme nous le verrons dans le Chapitre 11, la connexion par la tranche impose au capillaire d'entrée d'avoir un diamètre inférieur à celui du canal d'entrée, ce qui génère de nombreuses conséquences non négligeables pour l'écoulement comme : un effet restriction important dès le début du dispositif (et non à l'endroit souhaité), l'apparition de recirculations à la sortie du capillaire, l'impossibilité de bien placer le capillaire au centre de la largeur du canal et le déséquilibre qui en résulte.
- ✓ Par ailleurs, le capillaire n'est pas défini par une section parfaitement circulaire au niveau de son ouverture sur le canal car la colle peut parfois légèrement migrer dans le capillaire. La section de découpe du capillaire en silice est également rarement nette car elle contient souvent des débris de verre issus de la découpe.

L'ensemble de ces raisons peuvent largement justifier que l'écoulement ne soit pas homogène dès son entrée dans le dispositif, phénomène d'autant plus marqué pour les billes les plus grosses, et d'autant plus gênant ici que les conditions initiales sont fondamentales pour le principe de séparation utilisé.

B.3. Conclusion

Ce dispositif a montré des résultats très intéressants et prometteurs, avec un enrichissement d'un facteur 2 pour des injections de billes de 3 et 5 μ m. Quelques uns de ces résultats ont été présentés dans la publication [SOL 09.1] tandis que le principe original expliqué précédemment a fait l'objet d'un dépôt de brevet [ACH 08.2].

Malheureusement, le manque de reproductibilité observé pour des billes de 10 μ m justifie que des travaux supplémentaires soient nécessaires.

La première possibilité envisageable pour résoudre ce problème est le changement du mode de connexion, avec un capillaire d'entrée plus large que le canal dans lequel il s'insère. Cette perspective nécessite la mise en place d'un nouveau mode de packaging, qui sera proposé et détaillé dans le Chapitre 12. Une autre solution est l'intégration dans ce dispositif d'une étape de brassage de la suspension afin d'en homogénéiser la répartition avant son écoulement dans la brique de séparation.

Des expériences avec du sang très dilué seront ensuite menées sur ces puces nouvellement fabriquées et maintenant disponibles. En effet, le phénomène proposé est

fondé sur les conditions de l'écoulement et la migration latérale, qui s'applique tout particulièrement aux GR. Le modèle billes pour l'étude de la séparation a donc ses limites ici.

C. Conclusion et perspectives

Ainsi, les deux dispositifs originaux de $\frac{1}{2}$ canaux coudés présentés dans ce Chapitre 7 ont apporté des résultats prometteurs. Cependant le cadre de la thèse et les délais brefs associés ne permettaient pas de mener des études de faisabilité pour le tri sanguin et avec une bonne chance de succès.

C'est pourquoi le Chapitre 8 propose d'autres pistes, plus sûres, pour l'extraction du plasma par microfluidique passive, fondées sur l'exploitation de la migration latérale et des écoulements en singularités géométriques.

VIII. Développement de dispositifs pour l'extraction du plasma

Ce chapitre présente le développement de dispositifs d'extraction microfluidique du plasma, fondés sur des principes présentés dans le Chapitre 6. En particulier, la couche claire résultant de la migration latérale est augmentée par l'écoulement en singularités géométriques et par l'effet restriction.

La démarche suivie dans ce chapitre est systématique et quantitative. La première étape concerne l'analyse de quelques dispositifs d'extraction et leur comparaison en termes de rendement et pureté d'extraction, le but étant la mise en évidence un dispositif optimal. L'influence du débit et de la concentration de l'échantillon injecté est également prise en compte pour permettre une extraction dans les meilleures conditions. Enfin le dispositif optimal est soumis à différents tests de caractérisation biologique afin d'en valider le procédé d'extraction.

A. Banc expérimental

A.1. Dispositifs microfluidiques

Les conditions expérimentales utilisées au cours de ce chapitre sont les mêmes pour tous les dispositifs testés. Les puces utilisées ont été fabriquées selon la technologie PDMS, comme décrit dans le Chapitre 4. Pour chacune de ces puces, les canaux sont profonds de 100 μ m tandis que leur largeur varie de 200 μ m pour les canaux d'entrée à 600 μ m pour les canaux de sortie les plus larges. Chaque principe fluidique a été testé avec du sang humain (d'origine contrôlée EFS) dilué généralement au 1:20 avec du tampon PBS.

L'ensemble des dispositifs abordés au cours de ce chapitre est présenté dans le Tableau VIII-1 ci-dessous.

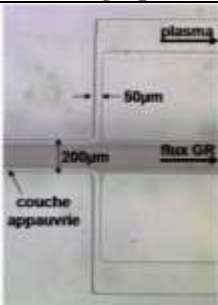
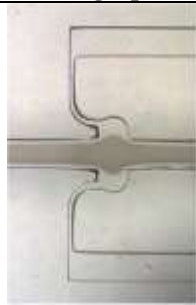
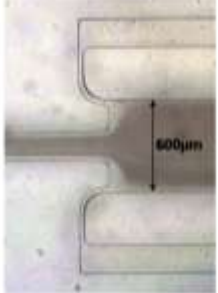

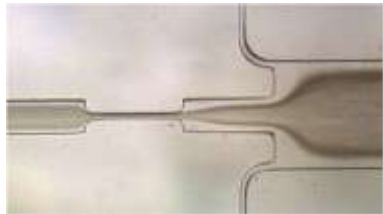

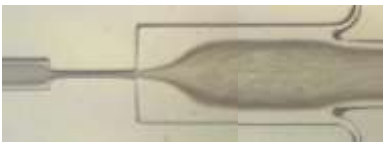
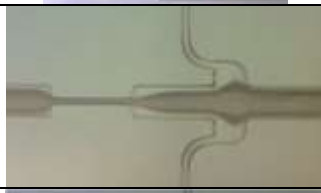
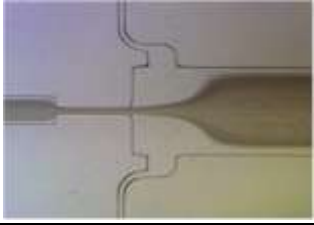
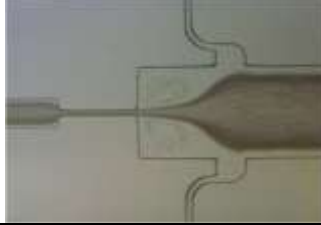
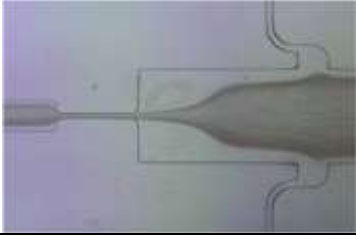
Dispo	Photographie	Principes	Dispo	Photographie	Principes
A		Couche appauvrie. = Référence microfluidique	B		Singularité Oreille
C		Singularité Elargissement	D		Restriction
E		Restriction Puis Elargissement	F		Restriction sur Elargissement (<i>Extraction en coin</i>)
G		Restriction sur Elargissement (<i>Extraction couche stabilisée</i>)	H		Restriction + Cavité
I0		Restriction + Elargissement + Cavité proche (200µm)	I1		Restriction + Elargissement + Cavité milieu (500µm)
I2		Restriction + Elargissement + Cavité lointaine (1000µm)			

Tableau VIII-1 : Récapitulatif des différents dispositifs d'extraction présentés dans ce chapitre. L'écoulement représenté est toujours de gauche à droite.

A.2. Principe d'extraction

Pour permettre l'extraction du plasma, des canaux de $50\mu\text{m}$ sont placés symétriquement de part et d'autre du dispositif, dans le même plan que la puce. Quelque soit le dispositif, le principe d'extraction est le même, comme illustré Figure VIII.1.a. Le sang dilué est injecté dans la puce par le canal d'entrée (I), avec un débit Q_I imposé par un pousse-seringues. Le débit de l'échantillon Q_O est également imposé dans le canal de sortie principale (O) par l'utilisation d'un second pousse-seringues. Le plasma est récupéré dans les deux canaux latéraux d'extraction (O_E), avec un débit cumulé Q_E . C_I , C_O et C_E sont les concentrations correspondantes pour chacun de ces canaux.

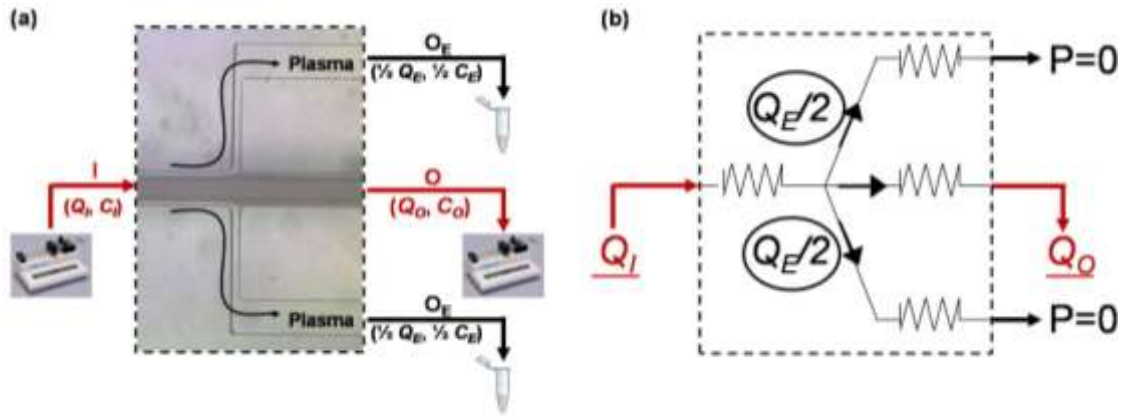


Figure VIII.1 : Principe de l'extraction du plasma dans nos dispositifs microfluidiques. (a) Illustration à partir de sang dilué 1:20 injecté à $100\mu\text{L}/\text{min}$ dans la puce. I est l'entrée du dispositif et O la sortie principale. Le plasma est extrait dans les deux canaux latéraux O_E et récupéré dans des tubes eppendorfs. Q_I , Q_O et Q_E sont les débits correspondants à chacun de ces canaux, avec Q_I et Q_O contrôlés par deux pousse-seringues. (b) Schéma électrique équivalent.

Comme expliqué par la conservation des débits (Equation VIII-1), cela revient à accroître progressivement Q_E .

$$Q_I = Q_O + Q_E \quad (\text{VIII-1})$$

On définit le taux d'extraction Q^* comme étant le rapport entre le débit d'extraction et le débit d'injection (Equation VIII-2).

$$Q^* = \frac{Q_E}{Q_I} \equiv \frac{V_E}{V_I} \quad (\text{VIII-2})$$

En pratique, pour un temps donné, ce paramètre exprimé en % correspond au volume de liquide extrait sur le volume total injecté.

A.3. Evaluation des performances d'extraction

Afin d'évaluer les performances des dispositifs d'extraction proposés et de comparer les dispositifs entre eux, il est nécessaire de commencer par la définition de certains paramètres, tels que le rendement et la pureté d'extraction. C'est l'objectif de la section suivante.

A.3.1. Rendement d'extraction

On définit le rendement d'extraction η comme étant le taux d'extraction maximal donnant un plasma clair (Equation VIII-3).

$$\eta = Q^*_{\max} = \left(\frac{Q_E}{Q_I} \right)_{\max} \equiv \left(\frac{V_E}{V_I} \right)_{\max} \quad (\text{VIII-3})$$

En pratique, pour un temps donné, ce paramètre exprimé en % correspond au volume maximum de liquide clair extrait sur le volume total injecté. Formulé d'une manière différente, c'est également le rendement volumique maximum de plasma clair que l'on peut extraire avec un dispositif donné.

Dans un premier temps, ce rendement d'extraction est évalué de manière qualitative. La démarche expérimentale suivie est présentée dans la Figure VIII.2 :

- ✓ On fixe Q_O et on fait varier progressivement Q_I . Du fait de la conservation des débits expliquée précédemment ($Q_I = Q_O + Q_E$), cela revient à accroître progressivement Q_E . Q_E est ainsi graduellement amplifié, aussi longtemps qu'une extraction de plasma clair est possible. En pratique, comme illustré sur la Figure VIII.1.a, l'interface entre le plasma clair et le flux de GR (appelée interface de séparation) se décale vers les parois au fur et à mesure que le taux d'extraction Q^* du plasma est augmenté.
- ✓ Après un taux d'extraction Q^* critique, les GR envahissent les canaux et contaminent le plasma comme représenté dans la Figure VIII.1.b. Ce Q^* maximum permettant d'obtenir un plasma clair définit le rendement d'extraction $\eta = Q^*_{\max}$ (Equation VI-3).

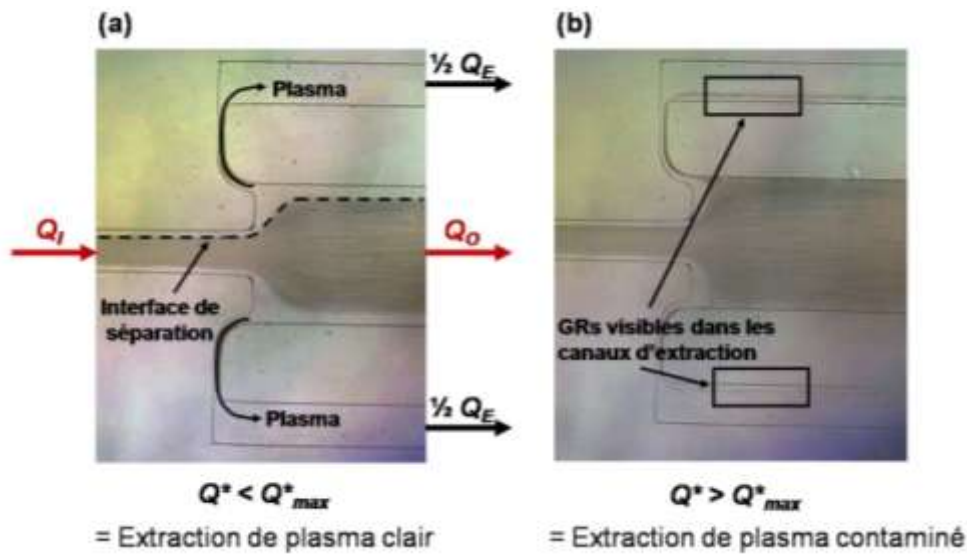


Figure VIII.2 : Estimation expérimentale du taux maximum d'extraction. Illustration à partir de sang dilué 1:20 injecté à 100 μ L/min dans la puce C décrite par la suite. (a) La frontière entre le plasma et le flux de GR, appelée interface de séparation (ligne en pointillés), se décale vers les parois au fur et à mesure qu'on extrait davantage de plasma, c'est-à-dire que Q^* augmente. (b) Passé un taux d'extraction critique (c'est-à-dire Q^*_{\max} ou η), les GR entrent dans les canaux latéraux et contaminent le plasma (rectangles).

Ainsi, pour résumer la démarche suivie, Q_O est fixé et Q_E indirectement augmenté jusqu'à ce que la valeur maximale possible de Q_E soit estimée pour ce Q_O considéré. Ce moment limite définit un rendement d'extraction η (ou Q^*_{\max}). Puis on décale Q_O et la démarche précédente est réitérée. Il est ainsi possible d'associer expérimentalement un rendement d'extraction η à chaque débit Q_O appliqué au dispositif.

Bien que cette détermination du taux maximum d'extraction soit visuelle et qualitative, elle n'est pas absurde. En effet, comme on le verra plus loin, ces valeurs déterminées par la seule visualisation en flux seront confirmées par d'autres moyens plus quantitatifs.

A.3.2. Pureté d'extraction

Pour chaque taux d'extraction Q^* , la pureté d'extraction peut être approximée par la notion de contamination en GR (C^*) dans le plasma extrait (Equation VIII-4).

$$C^* = \frac{C_E}{C_I} \quad (\text{VIII-4})$$

C^* est un pourcentage défini comme étant la concentration en GR dans les canaux d'extraction (C_E) rapportée sur la concentration initiale en GR de l'échantillon sanguin injecté (C_I). C_E et C_I sont mesurées avec la méthode décrite dans le Chapitre 4. Plus cette contamination est faible, plus la pureté d'extraction est élevée et meilleur est le dispositif. C'est-à-dire que la pureté d'extraction sera optimale pour une contamination nulle.

B. Extractions de référence

Pour toute caractérisation, qu'elle soit fluidique ou biologique, il sera nécessaire de comparer nos dispositifs à des techniques d'extraction connues. Pour cela deux méthodes de référence d'extraction du plasma seront communément utilisées au cours de ce chapitre. La première de ces méthodes est l'extraction macroscopique classique, c'est-à-dire la centrifugation en tube. Elle est essentielle, principalement pour l'évaluation biologique de nos dispositifs, car la plupart des analyses du plasma sont fondées sur cette centrifugation (Chapitre 2). La seconde méthode de référence choisie est l'extraction microfluidique par prélèvement direct du plasma dans la couche appauvrie. Cette référence nous permettra d'estimer les performances fluidiques de nos dispositifs.

B.1. Référence macroscopique

La technique macroscopique de référence pour l'extraction du plasma est la centrifugation en tube à l'aide d'une centrifugeuse (Biofuge pico, Heraeus). Une centrifugation à 1500g pendant 5min à température ambiante permet de culotter la plupart des GR et PLT. La phase supérieure faite majoritairement de plasma peut alors être facilement prélevée. Parfois nous utiliserons une centrifugation plus douce, à 150g pendant 15min, afin d'obtenir un plasma riche en plaquettes (appelé PRP).

Cette technique est très efficace puisque, en utilisant une pipette appropriée et avec une certaine dextérité, il est possible d'extraire une grande partie du volume de plasma. Par exemple, considérons un échantillon de sang dilué 1:20, ayant un taux d'hématocrite initial de 45%. Une fois la dilution prise en compte, l'hématocrite passe à $45/20=2,25\%$, soit une proportion de liquide de $100-2,25=97,75\%$. Le rendement d'extraction η défini

précédemment peut alors atteindre une valeur de **95%**. La contamination en GR mesurée pour un plasma extrait par cette technique est d'environ **1%**.

Cette technique donne donc un rendement maximal. C'est une méthode classique, simple, rapide et la plus efficace qui soit. Mais elle reste macroscopique et non intégrable au sein d'un microsystème ; c'est dans ce sens qu'elle a ses limites.

B.2. Référence microfluidique

La technique microfluidique de référence choisie ici pour l'extraction du plasma est l'extraction directe et perpendiculaire de la couche appauvrie. Cette technique est la plus utilisée dans la littérature [JAG 07], où l'idée commune est généralement de réaliser plusieurs de ces extractions en série [YAN 06]. Les principales caractéristiques de ces dispositifs sont récapitulées dans la Figure VIII.3.c.

L'idée proposée par la littérature est de réaliser de multiples extractions de cette sorte en série. Ce que nous proposons ici est d'abord de modifier l'écoulement afin d'augmenter localement cette couche claire avant son extraction et ainsi d'augmenter le rendement d'extraction du dispositif unique avant une extraction en série. C'est pourquoi il sera difficile de comparer nos dispositifs à ceux proposés dans l'état de l'art en terme de rendement d'extraction.

B.2.1. Dispositif

Pour cela, le dispositif A représenté Figure VIII.3, est proposé afin d'avoir une référence microfluidique d'extraction de la couche claire. Des canaux, larges de 50µm, sont placés perpendiculairement au canal principal de 200µm et permettent d'extraire directement le plasma.

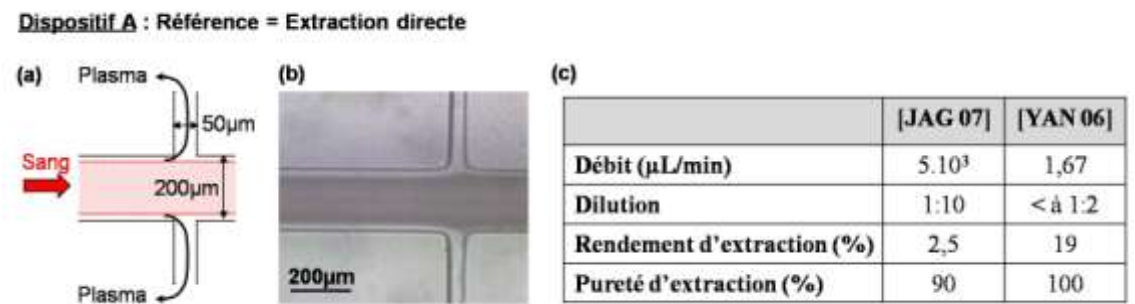


Figure VIII.3 : Dispositif A ; référence microfluidique exploitant directement la couche appauvrie. (a) Schéma du dispositif A et dimensions. (b) Photographie du dispositif A lors d'une injection de sang 1:20 à $Q_0=100\mu\text{L/min}$. (c) Caractéristiques des dispositifs proposés pour l'extraction de la couche appauvrie dans [JAG 07, YAN 06].

B.2.2. Rendement d'extraction et notion de régime de stabilité

Afin d'estimer le rendement d'extraction du dispositif de référence, le processus expérimental décrit ci-dessus est appliqué pour des débits Q_O de 10 à 200 $\mu\text{L}/\text{min}$. L'évolution de η avec Q_O est représentée Figure VIII.4.

Le rendement obtenu est à peu près constant, avec des valeurs de 3,8 à 5%, pour Q_O de 50 à 150 $\mu\text{L}/\text{min}$. Le rendement semble indépendant du débit, ce qui est compatible avec la stabilité des dimensions de la couche appauvrie en fonction du débit visualisée dans le Chapitre 6.

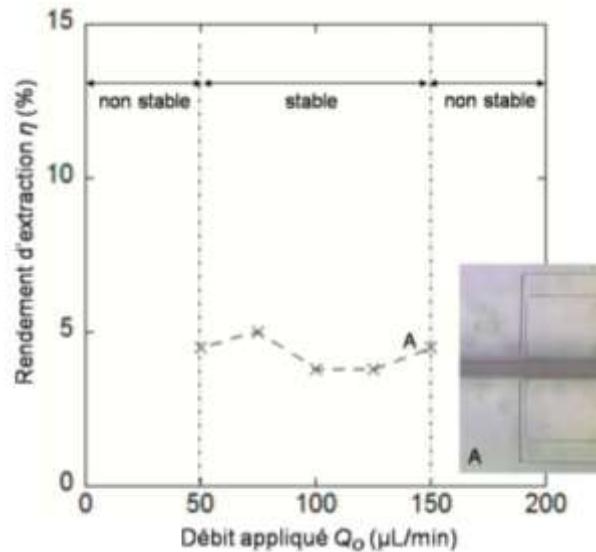


Figure VIII.4 : Performances du dispositif A de référence. Rendement d'extraction η du dispositif A versus débit appliqué (Q_O), comme une illustration du régime de stabilité.

Par ailleurs, cette représentation du rendement d'extraction en fonction du débit d'injection permet également de définir la gamme de fonctionnement en débits, c'est-à-dire les débits les plus adaptés pour notre extraction du plasma, ou en d'autres termes le régime de stabilité du dispositif considéré. En effet, en dehors de cette gamme de débits, il est difficile d'équilibrer le système fluide car les écoulements semblent instables :

- ✓ Pour les débits les plus faibles (jusque 25 $\mu\text{L}/\text{min}$), le pousse-seringue provoque un écoulement saccadé. L'injection par contrôle en débit nécessite un temps de mise en équilibre de l'écoulement dans le système. Ce temps est d'autant plus long que le débit d'injection est lent mais également que la connectique comprend des pertes de charges. C'est justement le cas ici où la connectique par la tranche, avec des capillaires aux diamètres très fins, induit des pertes de charges importantes. Ce point, qui est donc purement inhérent à notre connectique et non au phénomène physique, est expliqué davantage dans le Chapitre 4 et nous tenterons de le résoudre dans le Chapitre 11.

- ✓ Pour des débits plus importants (de 175 à 200 $\mu\text{L}/\text{min}$), le dispositif se déforme par à-coups. Ces instabilités peuvent s'expliquer principalement par la déformabilité du PDMS utilisé pour la microfabrication du dispositif. Ce problème est connu et a également été discuté dans le Chapitre 4.

- ✓ Pour des débits encore plus élevés (à partir de 225-250 $\mu\text{L}/\text{min}$), un nouveau problème s'ajoute aux deux précédents ; le packaging du dispositif ne supporte pas la pression exercée et le dispositif se met à fuir au niveau de ses entrées. Ce problème est à

relier aux pertes de charges dues à la connectique. Des tentatives pour résoudre ce problème de connectique seront présentées dans le Chapitre 11.

Pour résumer, trois problèmes bornent cet intervalle de travail en débits : la déformabilité du PDMS, le packaging de la puce et le mode d'injection choisi. Ces différents problèmes pourraient être réduits respectivement par l'utilisation de microsystèmes en silicium, par la mise en place d'un nouveau mode de packaging et par l'injection des échantillons par contrôle en pression. Ces deux derniers points seront abordés avec plus de détails dans la partie Intégration.

B.2.3. Pureté d'extraction

Dans la Figure VIII.8.a, la contamination C^* estimée dans les canaux d'extraction du dispositif A est représentée en fonction du taux d'extraction Q^* . Ces mesures ont été réalisées à partir de l'extraction du plasma d'un échantillon de sang dilué au 1:20 injecté à 100 μ L/min.

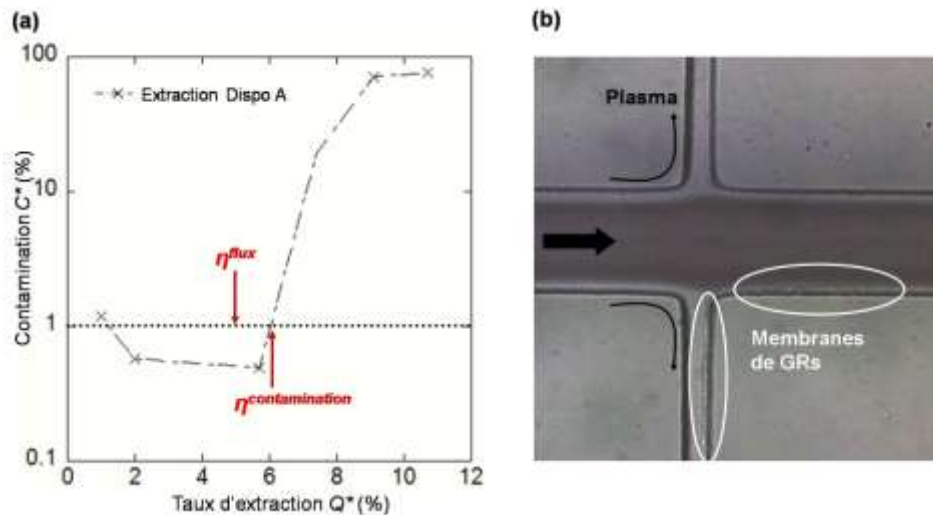


Figure VIII.5: Performances du dispositif A de référence. Extraction à partir d'un échantillon dilué 1:20 et injecté à 100 μ L/min. (a) Contamination C^* en GR versus taux d'extraction Q^* . C^* est représentée avec un axe logarithmique. La valeur 1% (ligne en pointillés) représente la contamination obtenue pour du plasma extrait par centrifugation classique. (b) Photographies de quelques débris membranaires de GR générés par l'extraction du plasma directement dans la couche appauvrie.

L'évolution de C^* avec l'augmentation du taux d'extraction Q^* est cohérente avec le principe expérimental expliqué dans la Figure VIII.2.

✓ En effet, pour des taux d'extraction Q^* inférieurs à 6%, C^* reste faible et aux alentours de 1%, ce qui correspond à la contamination obtenue pour un plasma extrait par centrifugation classique. Cette première étape correspond à la collection en continu d'un plasma clair ainsi qu'à la translation progressive de l'interface de séparation vers les canaux d'extraction, comme expliqué et illustré dans la Figure VIII.2.a.

✓ Puis, à partir d'un Q^* critique de 6%, C^* franchit les 1% et monte soudainement à environ 20%. Cette seconde étape correspond à l'invasion des GR dans les canaux d'extraction, comme illustré dans la Figure VIII.2.b.

En appelant η^{flux} le taux d'extraction critique estimé par l'observation en flux et $\eta^{contamination}$ celui estimé par cette évolution de la contamination, on a $\eta^{flux} = 5\%$ et $\eta^{contamination} = 6\%$, soit juste 1% de différence. Ces résultats confirment donc quantitativement la valeur du rendement d'extraction η estimé par la seule visualisation en direct de l'injection.

Le dispositif de référence donne une contamination similaire à la méthode de centrifugation classique. Cependant, comme illustré Figure VIII.5.b, ce dispositif semble générer rapidement des débris membranaires de GR. Ces observations peuvent s'expliquer par le fait que ce dispositif prélève le plasma directement le long de l'écoulement des GR. Des GR entrent en collision avec l'entrée du canal d'extraction (sur le coin de la jonction), allant même jusqu'à éclater. Ce qui pourrait expliquer la présence de ces débris de membranes à ce niveau du dispositif.

B.2.4. Conclusion

Les performances du dispositif de référence microfluidique ont été évaluées en termes de rendement d'extraction et de contamination en GR. Le rendement d'extraction est de 3,8 à 5% pour des débits de 50 à 150 $\mu\text{L}/\text{min}$. Cette valeur est très largement loin des 95% obtenus par la centrifugation classique. Il reste donc encore un volume important de plasma à récupérer, ce qui laisse envisager qu'une optimisation fluidique de ce dispositif de référence est largement possible.

On peut réitérer ici l'idée alternative proposée précédemment, à savoir qu'il serait souhaitable et original d'augmenter localement cette couche de plasma clair avant son extraction en série. Cela permettrait d'augmenter le rendement d'extraction de ce dispositif et de limiter ce problème de débris membranaires. C'est l'objectif des dispositifs présentés dans les sections suivantes et qui exploitent les singularités géométriques.

Pour la suite, on rappelle dans le Tableau VIII-2 ci-dessous les performances obtenues pour les deux méthodes de référence d'extraction du plasma.

Méthodes d'extraction	Rendement η	Contamination C^*
Référence macro : Centrifugation	95 %	1 %
Référence micro : Dispositif A	4-5 %	0,5-1,2 %

Tableau VIII-2 : Rappel des performances obtenues pour les deux méthodes de référence d'extraction du plasma.

C. Effet de l'ajout de singularités géométriques

Trois singularités géométriques sont proposées dans cette section afin d'augmenter localement la couche claire de plasma. Ces singularités sont fondées sur les résultats du Chapitre 6 ; l'élargissement du canal, l'oreille placée le long du canal et la restriction du canal. Ces dispositifs sont successivement présentés puis leurs performances sont évaluées et comparées.

C.1. Oreille et Elargissement

C.1.1. Dispositifs

✓ Dispositif B : Comme représenté dans les Figure VIII.6.a et b, les canaux d'entrée et de sortie sont larges de $200\mu\text{m}$. Deux cavités circulaires identiques, de diamètre $\varnothing=200\mu\text{m}$, sont placées symétriquement le long du canal. Les canaux des sorties d'extraction sont larges de $50\mu\text{m}$ et placés au niveau des oreilles, permettant une extraction dans le sens opposé à celui de l'écoulement principal.

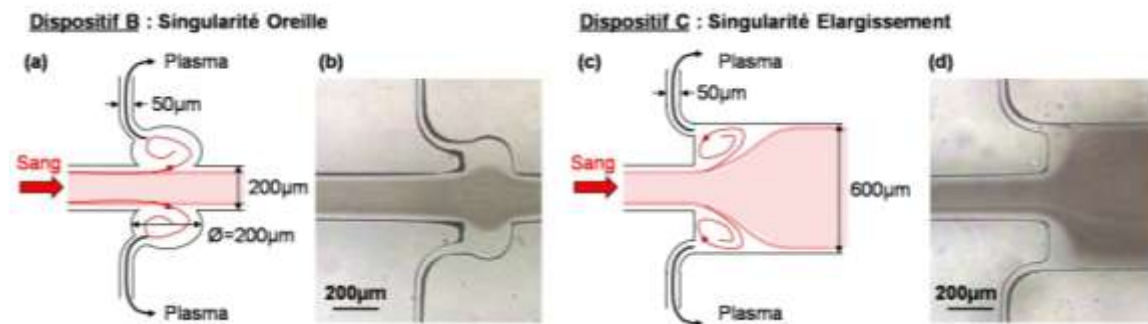


Figure VIII.6 : (a, b) Dispositif B et singularité Oreille. (a) Schéma du dispositif et dimensions. (b) Photographie du dispositif lors d'une injection de sang 1:20 à $Q_0=100\mu\text{L}/\text{min}$. (c, d) Dispositif C et singularité Elargissement. (c) Schéma du dispositif et dimensions. (d) Photographie du dispositif lors d'une injection de sang 1:20 à $Q_0=100\mu\text{L}/\text{min}$.

✓ Dispositif C : Comme précédemment, et comme illustré dans les Figure VIII.6.c et d, le canal d'entrée et les canaux des sorties d'extraction sont larges de 200 et $50\mu\text{m}$ respectivement. Le canal principal s'élargit de 200 à $600\mu\text{m}$, avec un élargissement symétrique par rapport au canal amont.

L'idéal dans ces dispositifs aurait été d'extraire au centre des vortex mais ce mode d'extraction n'est pas compatible avec notre connectique par la tranche.

C.1.2. Rendements d'extraction

Le processus expérimental décrit précédemment a été appliqué aux deux dispositifs B et C, pour différents débits Q_0 variant de 10 à $200\mu\text{L}/\text{min}$, afin d'évaluer au mieux le rendement d'extraction des différentes géométries proposées. La Figure VIII.7 compare l'évolution du rendement d'extraction η en fonction du débit appliqué Q_0 , obtenue pour trois dispositifs : les dispositifs B et C ainsi que le dispositif A de référence.

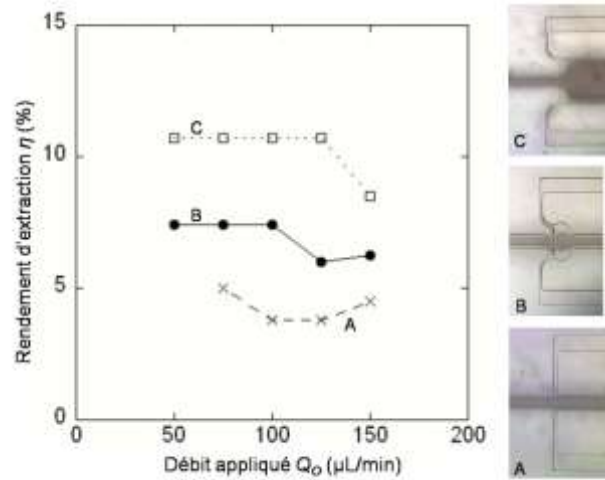


Figure VIII.7: Rendements d'extraction η versus débit appliqué Q_0 pour les dispositifs A, B et C correspondant respectivement à la référence microfluidique, la cavité et l'élargissement.

L'extraction dans l'élargissement (dispositif C) donne un rendement de 10,7%, ce qui est meilleur que les 7,4% obtenus dans l'oreille (dispositif B). Ces deux dispositifs sont plus efficaces que le dispositif de référence A, pour lequel le rendement n'est que de 5% dans le meilleur des cas.

On retrouve ici le régime de stabilité obtenu précédemment pour le dispositif A, à savoir 50-150 $\mu\text{L/min}$. Il semble y avoir peu d'effet du débit ici puisque le rendement est constant dans l'intervalle considéré, ce qui valide encore une fois le constat énoncé dans le Chapitre 6. Ce point est très intéressant dans la perspective d'une intégration en microsystème. Dans cet intervalle, 100 $\mu\text{L/min}$ semble être un débit de travail approprié : il donne un bon rendement d'extraction avec une stabilisation rapide du montage fluidique et un débit conséquent.

C.1.3. Puretés d'extraction

Dans la Figure VIII.8, la contamination C^* est représentée en fonction du taux d'extraction Q^* , pour du sang dilué au 1:20 injecté à 100 $\mu\text{L/min}$, et pour les deux dispositifs précédents B et C. Les contaminations obtenues sont également comparées à celle présentée précédemment du dispositif A.

Comme expliqué précédemment, l'évolution de la contamination C^* avec l'augmentation de Q^* est cohérente avec le principe expérimental expliqué dans la Figure VIII.1. On obtient graphiquement un $\eta^{\text{contamination}}$ de 7,5% pour le dispositif B et de 10% pour le dispositif C. Ces valeurs sont cohérentes avec les η^{flux} de 7,4 et 10,7% mesurés dans la Figure VIII.7.

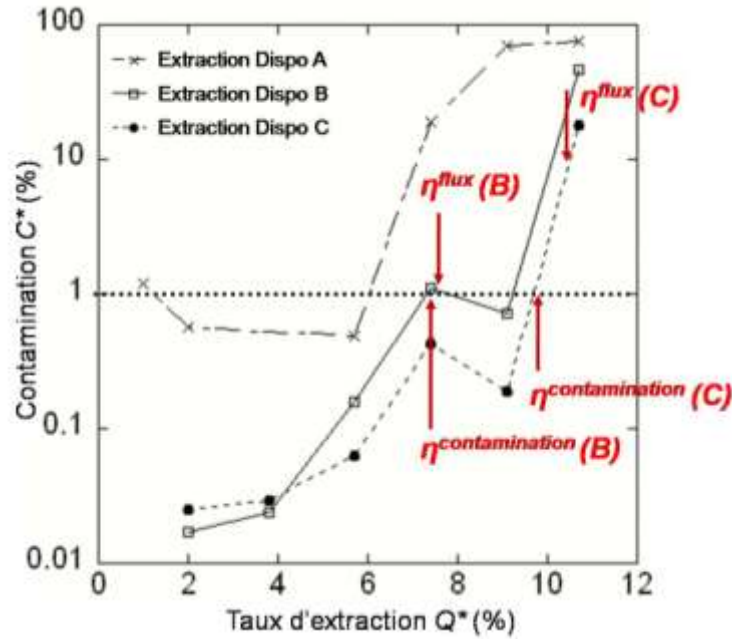


Figure VIII.8: Caractérisation du plasma et contamination en GR. C^* est représentée avec un axe logarithmique en fonction de Q^* . Comparaison entre les dispositifs Référence, Cavité et Elargissement, pour du sang dilué 1:20 injecté à 100 μ L/min. La valeur 1% (ligne en pointillés) représente la contamination en GR obtenue pour du plasma extrait par centrifugation classique.

Pour nos deux dispositifs et des faibles taux d'extraction Q^* , C^* reste faible et inférieur à 1%, c'est-à-dire à la contamination obtenue pour un plasma extrait par centrifugation classique. Ce graphe permet d'affirmer que, sur l'intervalle de taux d'extraction considéré, la pureté en GR du plasma peut être qualifiée comme excellente dans les deux dispositifs proposés.

En comparaison, le dispositif de référence donne une contamination beaucoup plus élevée, même aux faibles taux d'extraction. Par ailleurs, le problème de débris membranaires qui avait été mis en évidence dans la Figure VIII.5.b n'a pas été visualisé pour ces dispositifs B et C. Ces deux différences majeures confirment l'hypothèse émise précédemment : le dispositif de référence extrait le plasma directement dans la couche claire, le long de l'écoulement des GR, ce qui augmente la probabilité que des GR entrent dans le canal d'extraction. Tandis que dans les singularités proposées, l'extraction est décalée par rapport au flux principal de GR et a lieu dans une région où le plasma clair occupe un volume délimité plus important.

Il ressort également de ce graphe que l'élargissement donne un rendement d'extraction meilleur que la cavité. La cavité est moins efficace car l'alimentation de sa zone claire résulte directement de la couche appauvrie, tandis que l'étendue de la zone claire de l'élargissement en est moins dépendante, notamment si le débit est plus important et que des effets inertiels interviennent. Cependant, il n'est pas certain qu'une optimisation géométrique de la cavité n'aurait pas donné de meilleurs résultats.

C.2. Restriction

C.2.1. Dispositif

Le dispositif D, quant à lui, présente une restriction du canal. En effet, comme illustré dans la Figure VIII.9, le canal principal large de 200µm se réduit à une largeur de 50µm sur une distance de 500µm. Comme dans le cas du dispositif A, les canaux d'extraction larges de 50µm sont placés perpendiculairement au canal principal, en aval de la restriction (1500µm) afin d'extraire directement la couche claire accentuée par l'effet restriction. Le principe utilisé par ce dispositif est similaire à celui des dispositifs proposés dans [FAI 06, KER 09].

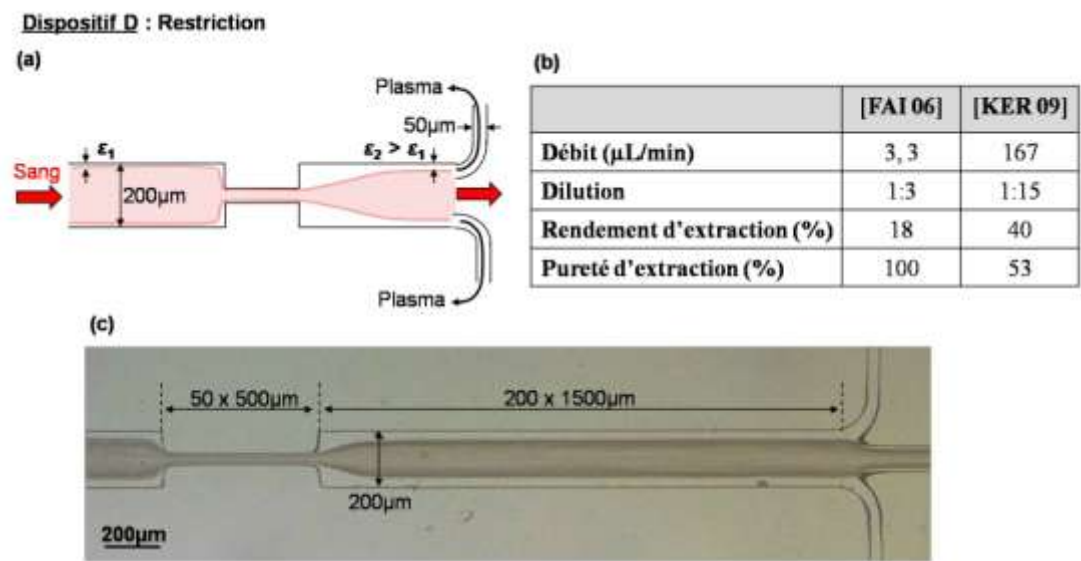


Figure VIII.9 : Dispositif D et restriction du canal. (a) Schéma du dispositif D et dimensions. (b) Caractéristiques des dispositifs proposés pour l'extraction de la couche appauvrie dans [FAI 06, KER 09]. (c) Photographie du dispositif D lors d'une injection de sang 1:20 à $Q_o=100\mu\text{L/min}$.

C.2.2. Rendement d'extraction

Comme précédemment, on applique au dispositif D le processus expérimental décrit Figure VIII.2, pour Q_o de 10 à 200µL/min afin d'obtenir l'évolution du rendement d'extraction η en fonction de Q_o . Celle-ci est représentée Figure VIII.10.

Le dispositif D est meilleur que le dispositif A puisque son rendement d'extraction est au moins deux fois supérieur : 10,7 versus 5%. Comme expliqué dans le Chapitre 6, l'effet restriction permet d'augmenter la couche appauvrie, ici de 19-21µm à 26-30µm, ce qui facilite l'extraction du plasma et en améliore le rendement.

Comme pour les dispositifs précédents, le débit a peu d'effet sur le rendement d'extraction dans l'intervalle de débits considérés, car le dispositif D est stable de 25 à 175µL/min.

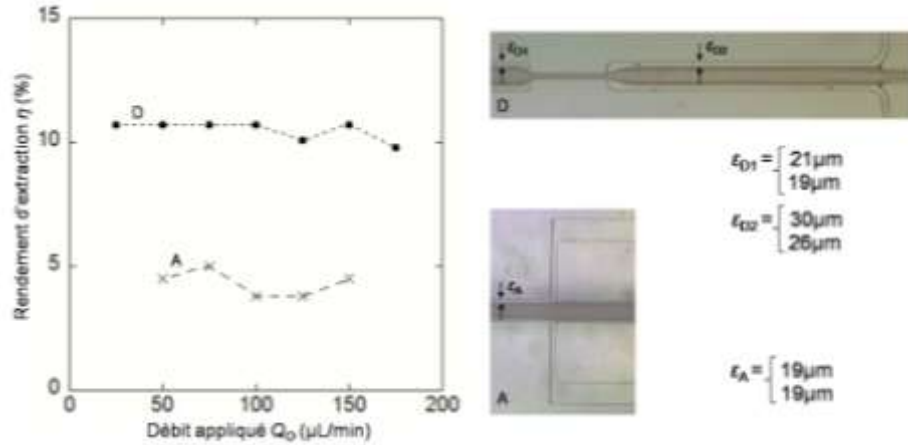


Figure VIII.10 : Rendements d'extraction η versus débit appliqué Q_0 pour les dispositifs A et D correspondant à la référence microfluidique et à la restriction.

C.3. Comparaison des différentes singularités géométriques

Les trois singularités géométriques étudiées précédemment - l'élargissement, la cavité et la restriction - sont comparées dans la Figure VIII.11.

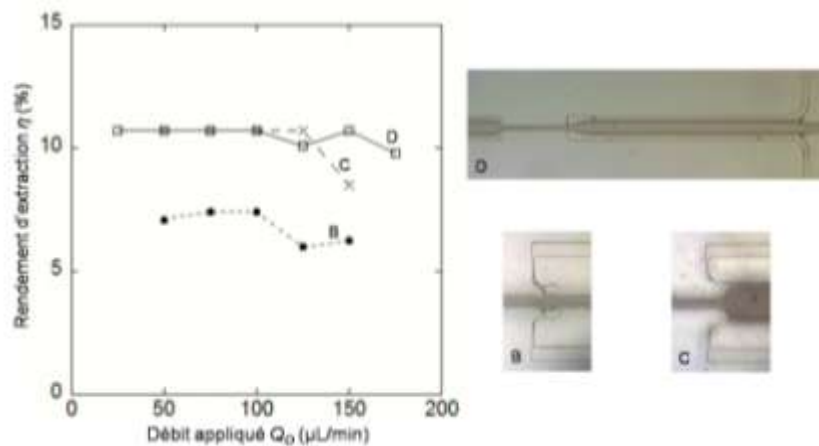


Figure VIII.11 : Rendements d'extraction η versus débit appliqué Q_0 pour les dispositifs B, C et D correspondant respectivement à la cavité, l'élargissement et la restriction.

Chaque singularité a un intérêt qui a été mis en évidence précédemment, leur rendement étant de 1,4 à 2 fois supérieur à celui du dispositif de référence. L'ajout d'une singularité géométrique à un canal rectiligne permet donc d'augmenter le phénomène naturel de couche appauvrie et d'améliorer le rendement d'extraction du plasma.

Comme illustré Figure VIII.11, les optimisations apportées sont telles que les singularités peuvent être classées de la manière suivante : cavité < élargissement = restriction, tout en rappelant que la géométrie de la cavité présentée ici n'a pas été optimisée. L'objectif est maintenant de coupler ces trois singularités afin d'augmenter le rendement d'extraction du plasma.

D. Effet du couplage des singularités

Afin d'augmenter les rendements d'extraction, différentes optimisations géométriques sont possibles en couplant les phénomènes évoqués précédemment, c'est-à-dire l'écoulement dans les singularités cavité et élargissement ou encore l'effet restriction. Nous avons passé en revue différentes géométries possibles afin de bien comprendre les différents leviers envisageables pour le futur dimensionnement de dispositifs.

D.1. Couplage restriction & élargissement

Essayons tout d'abord de coupler l'effet restriction à l'écoulement dans l'élargissement. La Figure VIII.12 présente les résultats obtenus.

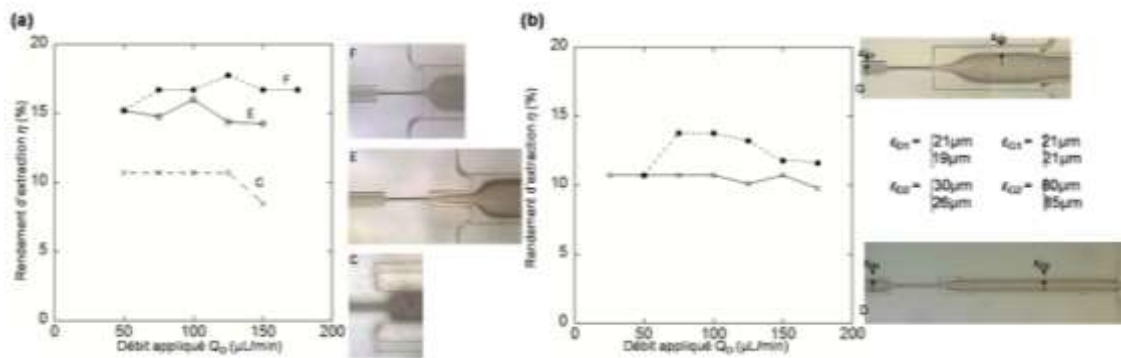


Figure VIII.12 : Rendements d'extraction η versus débit appliqué Q_0 pour les dispositifs C, E, F, D et G. Mise en évidence de l'intérêt du couplage restriction / élargissement.

- Dans la Figure VIII.12.a, le dispositif E introduit l'effet restriction avant l'élargissement; la couche appauvrie initiale est accentuée par la restriction géométrique du canal avant son utilisation par la singularité géométrique proposée. Le taux d'extraction obtenu est de 15%, ce qui valide l'optimisation due à l'effet restriction par rapport à la valeur de 10,7% du dispositif C. Le dispositif F, quant à lui, ouvre la restriction directement dans l'élargissement. En augmentant le facteur d'expansion de la singularité, et donc l'ampleur des tourbillons, ce dispositif permet d'augmenter le rendement d'extraction de 15 à plus de 17%.

- Dans la Figure VIII.12.b, le dispositif G réalise une extraction en couche appauvrie en ajoutant l'élargissement juste après la restriction. Comme expliqué dans le Chapitre 6, l'élargissement du canal en aval de la restriction permet d'étaler davantage la couche claire (30μm versus 80μm) et donc d'augmenter le rendement d'extraction de 10 à 13,8%.

A géométrie égale couplant restriction et élargissement, on compare dans la Figure VIII.13 le lieu de l'extraction, c'est-à-dire dans les coins de l'élargissement pour le dispositif F ou dans la zone appauvrie stabilisée pour le dispositif G.

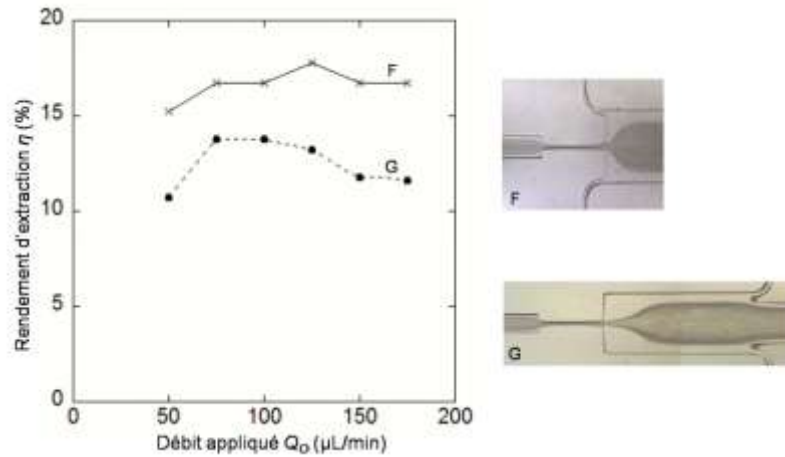


Figure VIII.13 : Rendements d'extraction η versus débit appliqué Q_0 pour les dispositifs F et G. Influence de la position de l'extraction.

Comme le dispositif F, le dispositif G exploite également l'effet restriction placé avant l'élargissement. Mais le plasma est prélevé directement dans la couche appauvrie stabilisée, d'une manière équivalente à celle proposée par [FAI 06, KER 09]. Le rendement obtenu est 13.8% dans nos conditions expérimentales. Par rapport aux 17,8% obtenus pour le dispositif F, cela confirme encore une fois l'intérêt d'une extraction au niveau de nos singularités.

D.2. Couplage restriction & cavité

Comme précédemment, essayons de coupler l'effet restriction à l'écoulement dans une singularité, ici la cavité. La Figure VIII.14 présente les résultats obtenus.

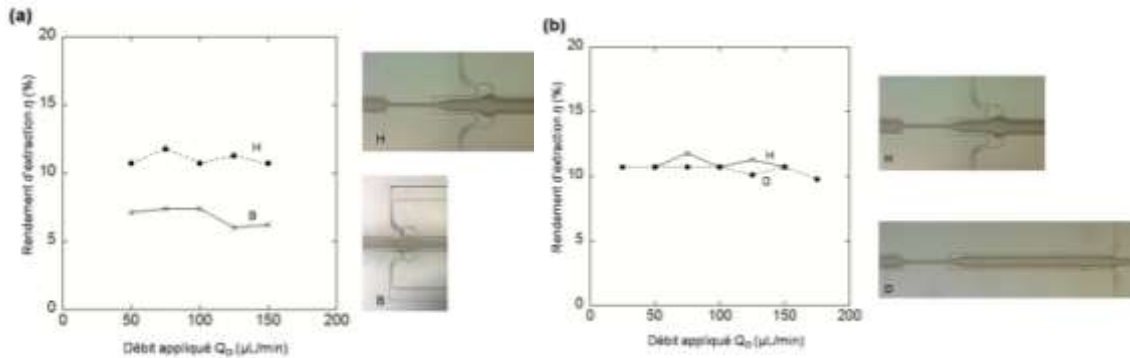


Figure VIII.14 : Rendements d'extraction η versus débit appliqué Q_0 pour les dispositifs B, D et H. Mise en évidence de l'intérêt du couplage restriction / cavité.

- Dans la Figure VIII.14.a, le dispositif H introduit l'effet restriction avant la cavité ; la couche appauvrie initiale est accentuée par la restriction géométrique du canal avant son utilisation par la singularité géométrique proposée. Le taux d'extraction obtenu est de 10,7%, ce qui valide l'optimisation due à l'effet restriction par rapport à la valeur de 7,4% du dispositif B.

- Dans la Figure VIII.14.b, l'extraction dans la cavité n'apporte pas de grande amélioration ici par rapport à l'extraction dans la couche appauvrie, ce qui illustre que la géométrie de la cavité n'est pas optimisée.

D.3. Couplage restriction & élargissement & cavité

D.3.1. Effet du couplage

La Figure VIII.15 récapitule et compare les principaux dispositifs couplés proposés précédemment.

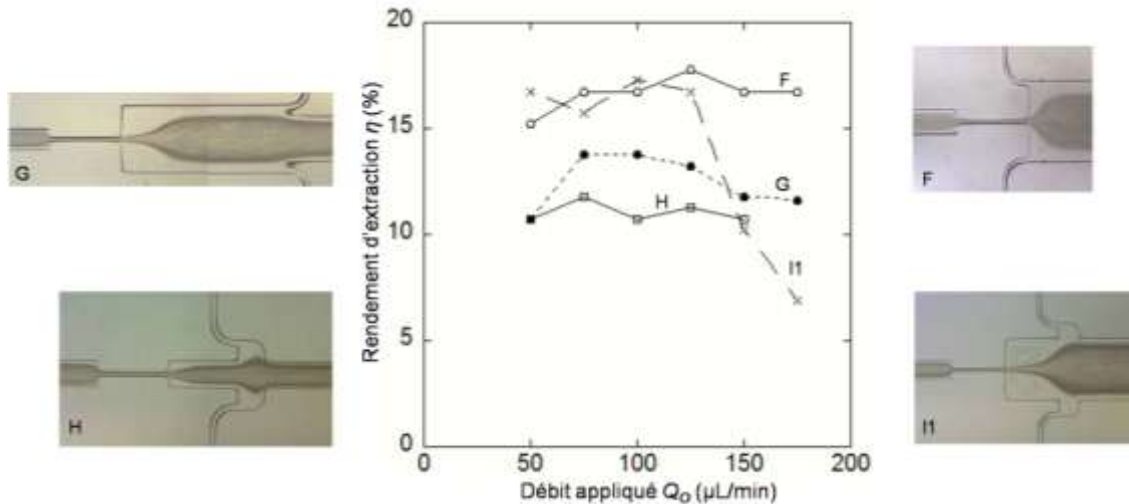


Figure VIII.15 : Rendements d'extraction et comparaison des dispositifs F, G, H et I1.

La comparaison des dispositifs F, G et H donne, en terme de rendement d'extraction, l'ordre suivant : $H < G < F$, ce qui valide l'intérêt du couplage des différents phénomènes ainsi que celui de l'extraction dans les coins de la singularité.

Le dispositif I1 rassemble simultanément les trois singularités proposées : la restriction, l'élargissement et la cavité. Au regard des 13,8% du dispositif G, les 17,3% obtenus pour le dispositif I1 confirment encore une fois l'utilité de nos singularités.

Ce graphe pose également la question de l'effet du débit sur la stabilité de l'extraction. En effet, alors que tous les dispositifs sont relativement stables dans l'intervalle de débits considérés, ce n'est pas le cas pour le dispositif I1. Malgré les très bons rendements obtenus pour ce dispositif (η reste constant autour de 17%), on remarque une très nette baisse du rendement d'extraction pour des débits supérieurs à 125 μL/min (10% à 150 μL/min et 6% à 175 μL/min). Les écoulements au sein de ce dispositif ne sont plus stables et ne permettent plus d'extraire correctement. A partir de 125 μL/min les recirculations, dont l'ampleur augmente avec le débit d'injection, occupent tout l'espace contenu entre l'élargissement et la cavité. Le point de recollement est directement placé à l'entrée de la cavité et le flux de GR contamine les canaux d'extraction.

Pour avoir une explication et mieux comprendre la différence entre les dispositifs F et I1, les cavités ont été placées à différents endroits de la zone appauvrie, afin d'en étudier l'influence sur la gamme de stabilité.

D.3.2. Position de la cavité

La Figure VIII.16.a compare trois dispositifs présentant des localisations de cavité différentes : la cavité est à 200 μm de l'élargissement pour le dispositif I0, à 500 μm pour le dispositif I1, et à 1000 μm pour le dispositif I2. Ce graphe représente l'évolution des rendements d'extraction obtenus en fonction du débit tandis que la Figure VIII.16.b montre les écoulements visualisés pour chaque dispositif à débits d'injections égaux (175 $\mu\text{L}/\text{min}$).

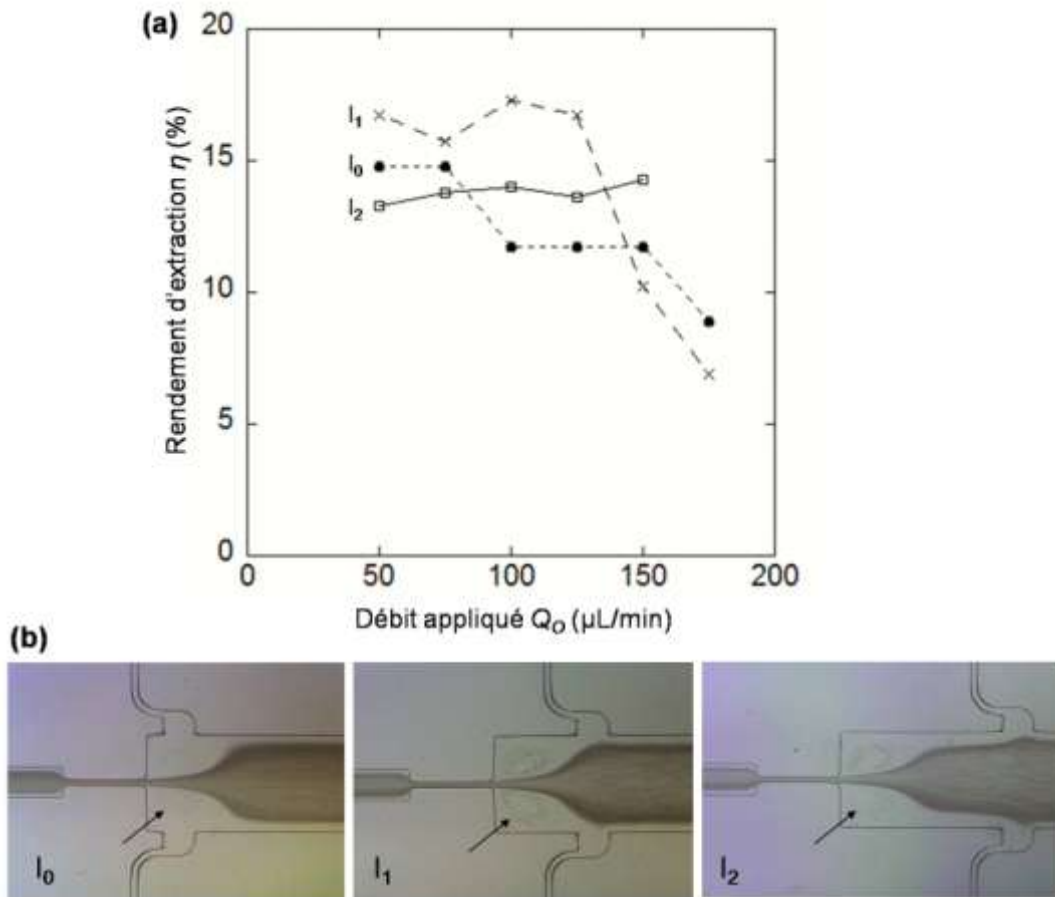


Figure VIII.16 : Influence de la position de la cavité. (a) Rendements d'extraction η versus débit appliqué Q_0 pour les dispositifs I0, I1 et I2. (b) Photographies d'injections de sang 1:20 à 175 $\mu\text{L}/\text{min}$.

- ✓ Dans le dispositif I0, la cavité est placée juste après l'élargissement. Dès que les recirculations dues à l'élargissement prennent de l'ampleur (75 $\mu\text{L}/\text{min}$), elles contaminent la cavité. Le rendement d'extraction chute rapidement. Ce qui signifie que la cavité est placée trop près de l'élargissement pour permettre une bonne extraction. On ne voit d'ailleurs pas ici les recirculations aussi bien que dans I1 et I2 à débits égaux puisqu'elles sont en partie absorbées dans la cavité.
- ✓ Dans le dispositif I1, les recirculations contaminent les cavités à partir de 125 $\mu\text{L}/\text{min}$. Le point de recollement tombe exactement dans la cavité.
- ✓ Dans le dispositif I2, les recirculations de l'élargissement n'atteignent jamais la cavité. La cavité est donc uniquement alimentée avec la couche appauvrie stabilisée après restriction.

En terme d'évolution du rendement d'extraction en fonction du débit d'injection, on a $I2 > I1 > I0$. On comprend donc facilement l'influence du débit sur les résultats obtenus, selon que les recirculations dues à l'élargissement atteignent la cavité ou pas ($I2$ est stable plus longtemps). En terme de rendement d'extraction effectif, on a $I1 > I0 > I2$. Le choix optimal ici nécessite donc un compromis entre stabilité et efficacité.

D.4. Conclusion

Les différentes optimisations réalisées confirment les résultats suivants : tout d'abord, la restriction a un effet très intéressant et efficace sur les dimensions de la couche appauvrie. Elle permet d'augmenter fortement le rendement d'extraction du plasma. Par ailleurs, l'élargissement donne un rendement plus important que la cavité. Enfin, le couplage de plusieurs recirculations est à éviter dans la mesure où les tourbillons peuvent se contaminer les uns les autres, comme dans le dispositif $I0$. Il en résulte que le dispositif optimal est le dispositif F, basé sur le couplage de l'effet restriction, de l'élargissement et d'une extraction dans les coins, dans le sens opposé à celui de l'écoulement principal.

Le dispositif F semble être le dispositif optimal en terme de rendement d'extraction (avec un rendement η allant jusqu'à 18% pour du sang dilué 1:20) mais également en terme de stabilité en débit (η est à peu près constant de 50 à 175 $\mu\text{L}/\text{min}$). Cette flexibilité au niveau des débits imposés est très importante pour la mise en œuvre d'un système intégré car elle illustre tout d'abord qu'il n'est pas nécessaire de régler les débits de façon très précise pour avoir un rendement d'extraction important. Par ailleurs ces dispositifs peuvent être compatibles avec un actionnement en pression même avec variations de viscosité. Pour toutes ces raisons, ce dispositif sera utilisé comme dispositif microfluidique de référence par la suite, pour des études telles que la validation biologique du plasma extrait.

Le rendement d'extraction obtenu est du même ordre de grandeur que celui de [FAI 06] mais encore inférieur à ceux de [YAN 06, KER 09]. Rappelons néanmoins que, par rapport à ces dispositifs de l'état de l'art qui cumulent les points d'extraction, il ne s'agit que d'une seule étape d'extraction, c'est-à-dire un motif élémentaire. La mise en série devrait nous permettre d'augmenter fortement ce premier rendement. Ce point sera abordé dans le Chapitre 11.

E. Effet de la dilution de l'échantillon

Le but final de notre système est d'extraire le plasma à partir d'un échantillon sanguin de quelques mL. Deux raisons justifient l'importance de réduire au minimum le facteur de dilution, si on ne peut augmenter le débit. D'une part, une dilution de l'échantillon diminue la concentration de l'analyte à doser et donc la sensibilité globale du test. Il est nécessaire de pouvoir toujours détecter les analytes du plasma extrait, quelque soit l'état du patient (pathologique ou non) et quelque soit l'analyte (protéine rare ou abondante). D'autre part, la dilution augmente le volume total à passer et donc le temps nécessaire à la séparation. A titre d'exemple, 1,5mL de sang pur passé à 150µL/min reste 10 minutes dans notre dispositif, tandis que 1,5mL de sang dilué 10 fois (soit un volume total de 15mL) requiert 100 minutes pour passer (soit 1h40).

E.1. Principe et dispositifs

Afin de réduire au mieux la dilution de travail, nous avons étudié l'effet de la dilution de l'échantillon sur le rendement d'extraction. Pour cela, différentes dilutions de sang ont été injectées à 100µL/min dans deux dispositifs, le dispositif B et le dispositif F. On appelle η le rendement d'extraction et η_{corr} le rendement corrigé par le facteur de dilution d , avec d variant de 0,02 à 0,22%, correspondant à des dilutions de 1:50 et 11:50 respectivement.

$$\eta_{corr} = \eta \times d \quad (\text{VIII-5})$$

E.2. Résultats

E.2.1. Effet sur le taux d'extraction

η et η_{corr} sont représentés en fonction de d dans la Figure VIII.17 ci-dessous. Dans l'intervalle de dilutions considérées, le rendement d'extraction η décroît quand l'échantillon est plus concentré (Figure VIII.17.a) mais trois sortes de comportements bien distincts peuvent être observés : une première phase linéaire, une dilution limite, précédée ou non d'une phase asymptotique.

✓ Pour d variant de 0,02 à 0,1% et pour les deux dispositifs, cette décroissance de η en fonction de d est linéaire, de 21 à 10% pour le dispositif F, et de 13 à 4% pour le dispositif B, avec $R^2 > 0,99$ dans les deux cas. Les pentes semblent quasiment identiques sur les deux courbes obtenues.

✓ Pour $d=0,1$ et le dispositif B, la dilution limite est mise en évidence; une extraction claire devient impossible car la zone appauvrie n'est plus assez large.

✓ Pour le dispositif F, le taux d'extraction évolue avec un comportement asymptotique pour un taux de dilution de 0,1 à 0,2%. Pendant cet intervalle, l'extraction d'une phase claire devient de plus en plus difficile car la couche appauvrie diminue fortement, mais cette extraction est néanmoins toujours possible. Pourtant, à partir de $d=0,22$, la limite de dilution est atteinte car la puce fuit au niveau de ses entrées. En effet, le sang étant un

fluide non newtonien, il devient trop visqueux et difficile à contrôler lorsqu'il est peu dilué. Ce comportement est cohérent avec les études reportées dans la littérature : à notre connaissance aucune extraction microfluidique n'a été menée sur sang non dilué.

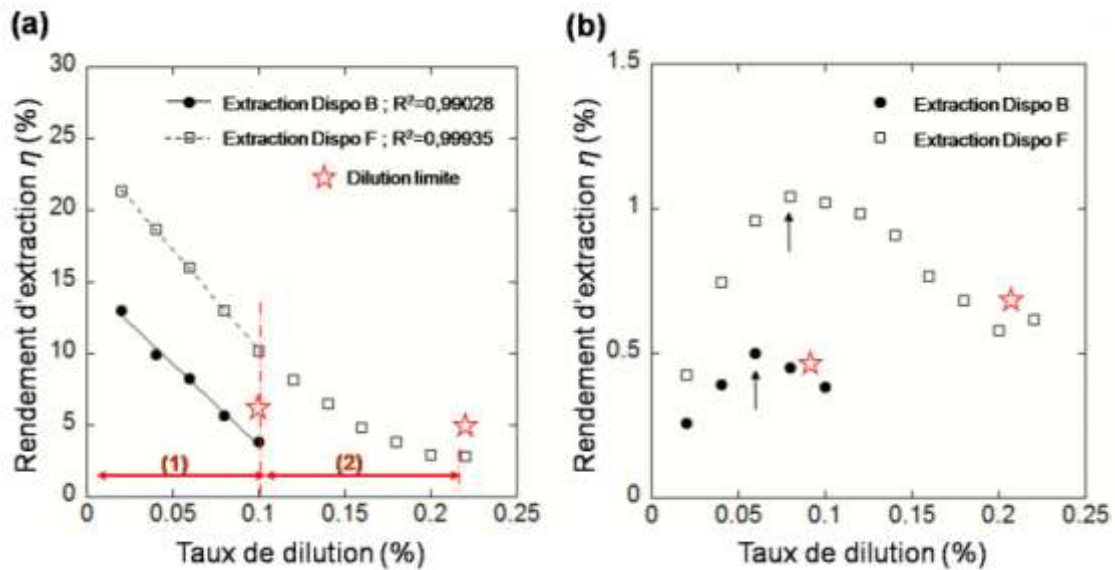


Figure VIII.17 : Extraction du plasma et effet dilution. (a) Rendement d'extraction η et (b) rendement corrigé η_{corr} pour deux dispositifs, B et F, à 100μL/min. La légende est commune aux deux graphiques, avec □ pour le dispositif F, ● pour le dispositif B et ☆ pour les dilutions limites. (1) et (2) représentent les différents comportements obtenus pour l'effet dilution, à savoir le comportement linéaire et asymptotique respectivement. Pour indications, 0,05%=1:20, 0,1%=1:10 et 0,2%=1:5.

Par ailleurs, ces résultats confirment que les dispositifs proposés sont robustes et utilisables sur une large gamme de dilutions mais également qu'une dilution limite existe quelque soit le dispositif considéré. Pour le dispositif B, c'est la limite supérieure de la géométrie qui a été mise en évidence. Par contre, pour le dispositif F, la limite obtenue correspond davantage à celle du montage fluidique qui ne semble pas adapté à la forte viscosité du sang. Nous avons conscience que ce problème technique est une limitation de notre dispositif. C'est pourquoi des solutions sont en cours d'étude au niveau du packaging de nos puces et feront l'objet du chapitre 9. Dans le cas du dispositif F, la limite supérieure de la géométrie n'a pas été testée et laisse à penser qu'il serait possible d'extraire du plasma à partir de sang plus concentré.

E.2.2. Effet sur le taux d'extraction corrigé

Sur la Figure VIII.17.b est représenté le rendement corrigé par la dilution pour les deux dispositifs B et F.

Ce rendement corrigé reste aux environs de 0,4% pour le dispositif Cavité, et varie de 0,4 à 1% pour le dispositif Optimal. Les deux évolutions obtenues se ressemblent fortement et sont à comparer avec la courbe représentant l'effet dilution sur la couche appauvrie dans le Chapitre 6 (Figure VI.12). On retrouve les mêmes effets, à savoir que le rendement d'extraction augmente avec la concentration de l'échantillon lorsque ces concentrations sont faibles et inférieures au 1:20 (la force de portance appliquée

augmente). Puis, à partir d'une dilution critique, le rendement chute avec la concentration de l'échantillon. Comme proposé par [PAR 09], ces résultats peuvent être expliqués par les interactions entre GR qui, à partir d'une concentration cellulaire trop importante, interfèrent avec le phénomène de migration latérale et empêchent les cellules d'être alignées et focalisées au centre du canal. Ces effets s'appellent les effets collectifs.

De façon plus pratique, ce rendement corrigé représente la quantité réelle de plasma pur obtenu et met clairement en évidence la présence d'une dilution optimale. Celle-ci donne un rendement d'extraction plus élevé, d'environ 0,06% pour la Cavité et de 0,08 à 0,1% ($d=1:10$) pour le dispositif Optimal.

E.3. Conclusion

Ainsi, une dilution "compromis" semble nécessaire pour obtenir une extraction optimale, c'est-à-dire qui permettrait d'être dans la limite de détection pour l'analyse ultérieure et qui donnerait le meilleur rendement d'extraction. Dans le cas du dispositif optimal, le facteur de dilution optimal possible (et compatible avec les méthodes de validation biologique) serait de $d=0,1$. C'est pour cela que les expériences suivantes de validation biologique sont réalisées à cette dilution 1:10.

F. Validation biologique du plasma extrait

Afin par la suite de coupler notre dispositif d'extraction à des microsystèmes analytiques, il est important de vérifier que le plasma extrait par notre dispositif microfluidique est biologiquement comparable à celui extrait par la technique macroscopique de référence.

Dans ce but, différents tests élémentaires de validation sont réalisés, tests dont le lecteur pourra trouver la mise au point dans le Chapitre 4. Pour chacun de ces tests, on compare simultanément deux plasmas issus du même échantillon sanguin : le plasma extrait par le dispositif microfluidique optimal F et le plasma extrait par centrifugation. Cette démarche est illustrée par la Figure VIII.18. Ces tests sont effectués à partir d'échantillons de sang dilués au 1:10 et sont reproduits à l'identique sur différents donneurs afin de vérifier que, malgré la variabilité d'un donneur à l'autre, notre dispositif est toujours valide.

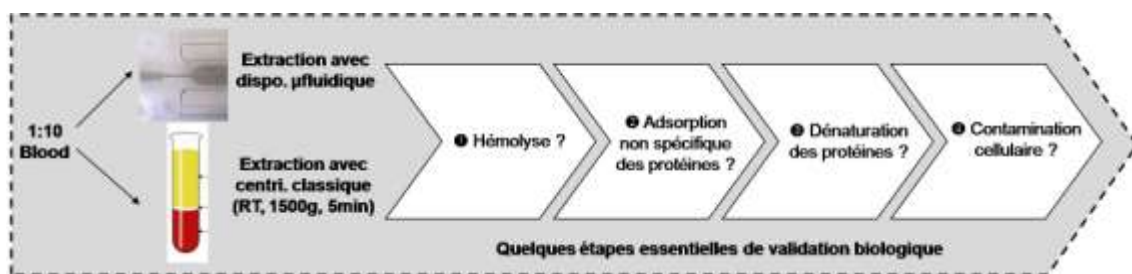


Figure VIII.18: Schématisation de la démarche à suivre lors de la validation biologique d'un dispositif d'extraction du plasma.

F.1. Caractérisation de l'hémolyse

L'hémolyse correspond à la lyse des GR suite à un stress trop important, comme par exemple un cisaillement ou une pression osmotique trop faible ou trop importante. Les GR contenant beaucoup d'hémoglobine (30pg dans un GR), leur lyse entraîne un relargage massif de cette protéine en solution. Or l'hémoglobine est un contaminant pour beaucoup d'analyses de diagnostic, telles que la PCR ou les analyses protéomiques. Donc quelle que soit l'analyse réalisée ensuite sur le plasma extrait, le risque d'hémolyse doit tout d'abord être détecté afin d'éviter cette contamination par l'hémoglobine.

Dans ce but, le pourcentage de lyse est mesuré pour cinq extractions réalisées à partir d'échantillons provenant de cinq donneurs différents (plasma μ Syst). Ces pourcentages sont comparés à ceux obtenus pour le plasma extrait par centrifugation classique des mêmes échantillons initiaux (plasma Centri). Le pourcentage indiqué sur chaque histogramme de la Figure VIII.19 représente l'écart relatif entre plasma Centri et plasma μ Syst, rapporté sur la valeur de référence plasma Centri. Les plasmas extraits, que ce soit par microfluidique ou par centrifugation, sont dilués au 1:2 (soit une dilution finale 1:20 au moment de l'analyse) de manière à se situer dans la gamme de dilutions appropriées à la méthode de Cripps et mises en évidence dans le Chapitre 4.

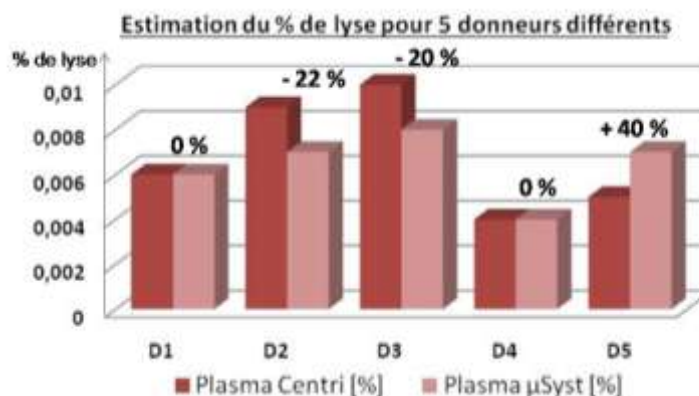


Figure VIII.19: Caractérisation du plasma extrait à partir du sang de 5 donneurs humains (D1, D2, D3, D4, D5). Estimation des pourcentages de lyse par la méthode de Cripps. L'extraction « μ Syst » a été obtenue à partir de sang dilué 1:10 injecté à 100 μ L/min dans le dispositif optimal F. L'extraction « Centri » a été obtenue par centrifugation des mêmes échantillons dilués 1:10. Les plasmas extraits sont dilués au 1:2 avant l'analyse, soit une dilution finale 1:20, afin d'être dans la gamme conseillée dans le Chapitre 4. Le % indiqué sur chaque histogramme correspond à l'écart relatif (plasma Centri – plasma μ Syst) / plasma Centri.

Pour chacun des cinq donneurs, les pourcentages de lyse estimés sont généralement compris entre 0,004 et 0,01%. Dans deux cas sur cinq, les pourcentages sont strictement identiques entre le plasma Centri et le plasma μ Syst, soit un écart relatif de 0%. Dans deux autres cas, le plasma Centri est davantage lysé que le plasma μ Syst, avec un écart de 22 et 20%. Le plasma μ Syst est plus lysé que le Centri dans un seul cas sur les cinq considérés, avec un écart de 40%. L'ensemble de ces variations demeure néanmoins négligeable. Ainsi il est cohérent d'affirmer que les pourcentages de lyse obtenus pour le plasma μ Syst et le plasma Centri sont similaires.

Ces résultats confirment que les GR ne semblent pas avoir relargué d'hémoglobine dans le plasma et donc que notre dispositif ne semble pas générer d'hémolyse notable.

F.2. Caractérisation de l'adsorption des protéines

Si le plasma est extrait en vue d'une analyse protéique, il est également nécessaire de détecter une éventuelle adsorption des protéines sur les surfaces du dispositif qui sont importantes. Si la protéine ciblée pour l'analyse est rare, la moindre adsorption non spécifique dans le dispositif diminuera sa concentration en sortie de dispositif, faussant le résultat de l'analyse. Pour cela, différents tests élémentaires sont réalisés dans cette partie.

F.2.1. Dosage global

La première étape consiste en l'estimation de la quantité globale de protéines présentes dans l'échantillon. Ce dosage se fait par l'utilisation de la loi de Beer-Lambert appliquée à la longueur d'onde 280nm, comme expliqué en détails dans le Chapitre 4, et permet d'approximer $[protéines]$, la concentration en protéines dans l'échantillon considéré.

Cette concentration est déterminée pour les cinq échantillons de plasma précédents et comparée, dans la Figure VIII.20, aux plasmas témoins centrifugés. Comme précédemment, les plasmas extraits sont dilués au 1:2 (soit une dilution finale 1:20 au moment de l'analyse) de manière à se situer dans la gamme de dilutions appropriées à la méthode A280 et mises en évidence dans le Chapitre 4. Le pourcentage indiqué sur chaque histogramme indique l'écart relatif entre les concentrations des plasma Centri et plasma μ Syst.

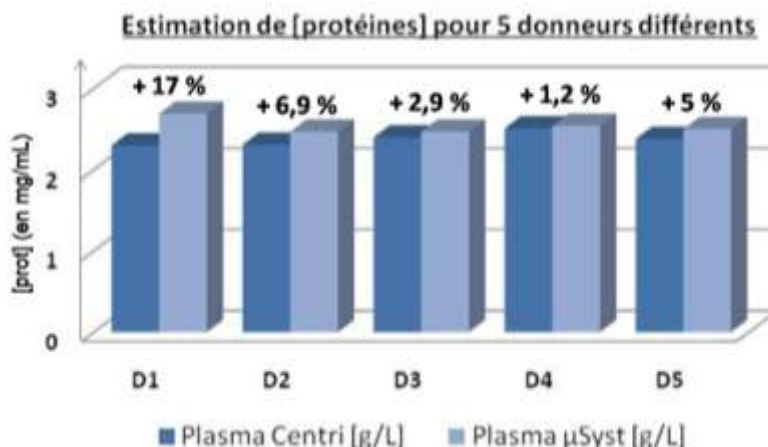


Figure VIII.20 : Caractérisation du plasma extrait à partir du sang de 5 donneurs humains (D1, D2, D3, D4, D5). Estimation des concentrations protéiques par la loi de Beer-Lambert à 280nm. L'extraction « μ Syst » a été obtenue à partir de sang dilué 1:10 injecté à 100 μ L/min dans le dispositif optimal F. L'extraction « Centri » a été obtenue par centrifugation des mêmes échantillons dilués 1:10. Les plasmas extraits sont dilués au 1:2 avant l'analyse, soit une dilution finale 1:20, afin d'être dans la gamme conseillée dans le Chapitre 4. Le % indiqué sur chaque histogramme correspond à l'écart relatif (plasma Centri – plasma μ Syst) / plasma Centri.

Pour chaque donneur, les quantités de protéines des plasmas extraits et centrifugés sont similaires et comprises entre 2,3 et 2,7g/L. Dans chacun des cas considérés, le plasma μ Syst semble même plus riche en protéines, avec un écart variant de 1,2 à 17%. Mais ces faibles variations ne sont cependant pas significatives.

Ces résultats indiquent qu'il ne semble pas y avoir de perte protéique notable causée par notre dispositif car le plasma extrait par microfluidique présente une concentration globale en protéines comparable au plasma extrait par centrifugation classique.

F.2.2. Dosage des protéines majoritaires

L'étape suivante consiste en un dosage plus spécifique, ciblé sur certaines protéines majoritaires du plasma. Ce dosage est réalisé par électrophorèse capillaire sur un Bioanalyser d'Agilent, comme expliqué dans le Chapitre 4, qui permet de séparer les protéines selon leur taille et de les quantifier.

Ce dosage est réalisé pour un plasma extrait d'un sang 1:10 (plasma μ Syst) et pour le plasma extrait par centrifugation classique du même échantillon initial (plasma Centri). Les deux spectres obtenus sont superposés sur la Figure VIII.21. Ces deux spectres se superposent parfaitement et illustrent qu'il n'y a pas d'adsorption spécifique d'une protéine majoritaire particulière qui serait passée inaperçue lors du dosage global.

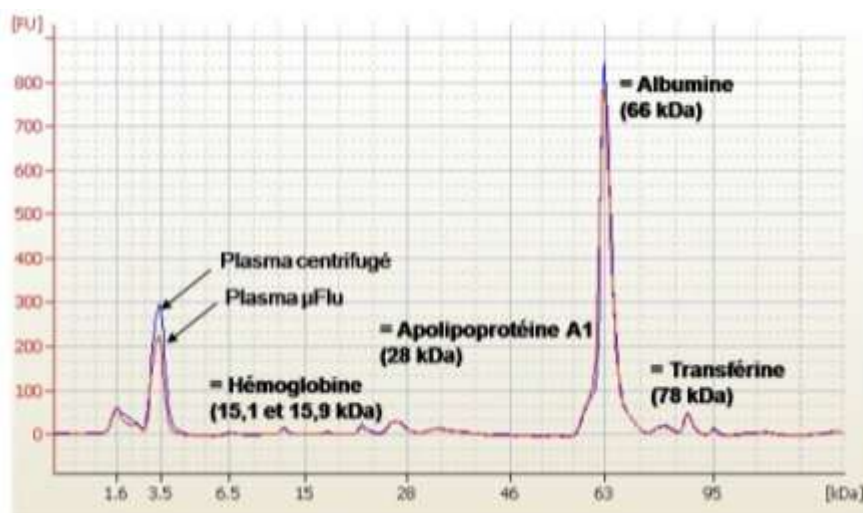


Figure VIII.21 : Electrophorégramme obtenu sur le Bioanalyser d'Agilent. Comparaison du spectre obtenu pour le plasma centrifugé (en bleu), et de celui obtenu pour le plasma microfluidique (en rouge). L'extraction « μ Syst » a été obtenue à partir de sang dilué 1:10 injecté à 100 μ L/min dans le dispositif optimal F. L'extraction « Centri » a été obtenue par centrifugation des mêmes échantillons dilués 1:10.

D'après ces résultats, aucune adsorption protéique non spécifique n'a été mise en évidence pour le cas des protéines majoritaires. Pour confirmer définitivement que nos dispositifs n'entraînent aucune adsorption protéique, il faudrait faire de même avec les protéines minoritaires, comme par exemple un biomarqueur [MEN 07].

F.3. Caractérisation de la dénaturation des protéines

Il a été montré précédemment que la quantité de protéines plasmatiques semblait bien conservée après extraction du plasma par notre dispositif microfluidique. Il faut maintenant vérifier que ces protéines, même présentes, soient encore actives et

fonctionnelles, c'est-à-dire que notre microsystème n'entraîne pas de dénaturation notable des protéines.

Pour vérifier l'intégrité des protéines, l'activité de deux enzymes plasmatiques données, les transaminases AST et ALT, a été mesurée. La mesure de cette activité enzymatique se fait à l'aide du système Cholestech, comme expliqué dans le Chapitre 4, où sont également présentées les gammes saines et pathologiques.

ALT et AST sont des membres de la famille des transaminases. Ces enzymes interviennent dans des réactions chimiques à l'intérieur des cellules. Le lecteur intéressé par plus de détails quant aux réactions catalysées pourra lire la notice technique [CHO 04]. D'un point de vue médical, la mesure des AST et ALT constitue un test sanguin de routine, fréquemment réalisé pour aider au diagnostic des maladies du cœur et du foie. En effet, le niveau d'ALT augmente rapidement lorsque le foie est endommagé (par une hépatite, une cirrhose, un cancer, une jaunisse...) tandis que l'AST est relarguée en excès dans le sang lors d'un dommage sur un tissu en général ou un organe (comme le cœur ou le foie entre autre). Le dosage AST/ALT est donc un exemple pertinent de dosage enzymatique à partir du sang [CHO 07].

Pour cela, quatre échantillons sanguins ont été enrichis en transaminases afin de simuler des cas pathologiques, puis dilués au 1:10. Les plasmas extraits par extraction microfluidique et centrifugation sont comparés dans la Figure VIII.22. Que ce soit pour l'AST ou pour l'ALT, l'écart absolu entre la mesure Centri et la mesure μ Syst est inférieur à 6%, ce qui est du même ordre de grandeur que les coefficients de variation du système (de 4,2% et 4,8%, respectivement pour l'ALT et l'AST [CHO 04]). Ce résultat est confirmé par le rapport AST/ALT donné par le système Cholestech et indiqué sur les histogrammes de chaque donneur : ce rapport est strictement identique entre le plasma Centri et le plasma μ Syst.

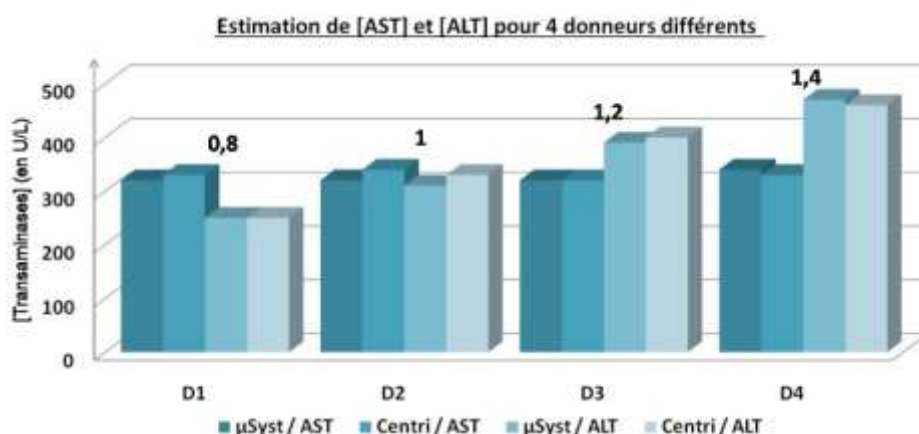


Figure VIII.22 : Caractérisation du plasma extrait à partir du sang de 4 donneurs humains (D1, D2, D3, D4). Estimation de l'activité des transaminases par le Cholestech. L'extraction « μ Syst » a été obtenue à partir de sang dilué 1:10 injecté à 100 μ L/min dans le dispositif optimal F. L'extraction « Centri » a été obtenue par centrifugation des mêmes échantillons dilués 1:10. La valeur indiquée sur chaque histogramme correspond au rapport AST/ALT.

Ces résultats illustrent sur les transaminases qu'il n'y a pas de dénaturation des protéines lors du passage de l'échantillon sanguin dans notre microsystème.

F.4. Caractérisation de la composition cellulaire

Pour vérifier la pureté cellulaire de nos échantillons, la contamination en PLT, GR et GB a été mesurée à différents taux d'extraction pour un plasma extrait d'un sang 1:20 (plasma μ Flu) et comparée à la contamination obtenue pour le plasma extrait par centrifugation classique du même échantillon initial (plasma Centri) dans la Figure VIII.23. Dans le cas des PLT, la contamination du plasma μ Flu a également été comparée à celle d'un plasma riche en PLT, le PRP. La contamination en PLT et GB est estimée après un marquage spécifique en fluorescence, comme expliqué dans le Chapitre 4, tandis que la contamination en GR est définie comme précédemment par comptage direct en lumière blanche.

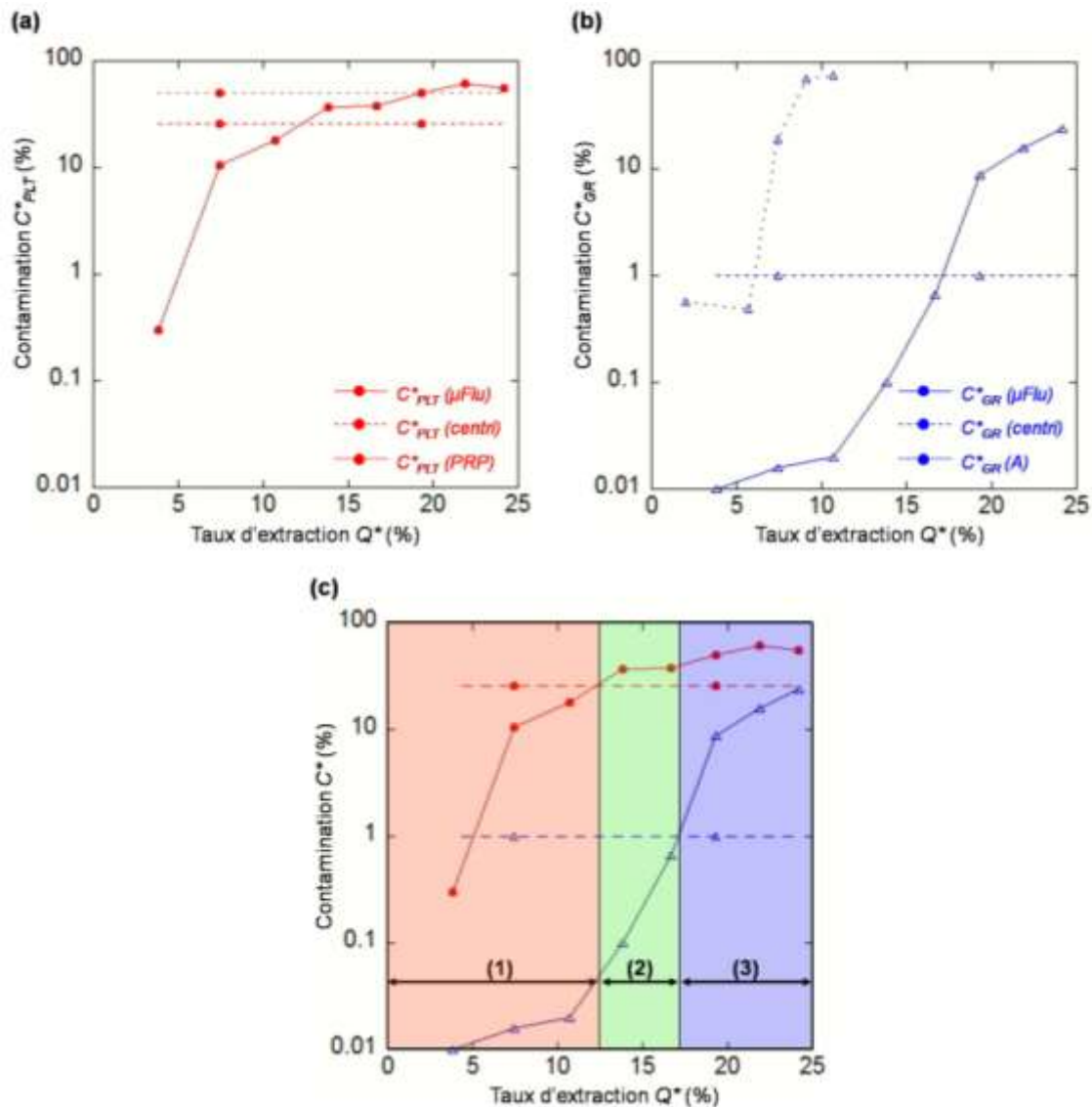


Figure VIII.23 : Mesure de la contamination cellulaire dans le plasma extrait. L'extraction « μ Flu » a été obtenue à partir de sang dilué 1:20 injecté à 100 μ L/min dans le dispositif optimal F. L'extraction « Centri » a été obtenue par centrifugation des mêmes échantillons. (a) Contamination en PLT dans les plasmas μ Flu, Centri et PRP. (b) Contamination en GR dans les plasmas μ Flu et Centri et comparaison avec la contamination obtenue pour le dispositif de référence A. (c) Evaluation comparée des contaminations en PLT et GR, avec (1) la zone appauvrie en cellules, (2) la zone riche en PLT et (3) la zone riche en PLT et GR.

La Figure VIII.23 représente ces contaminations en fonction du taux d'extraction. Pour l'instant, on peut en déduire les choses suivantes :

- Sur la Figure VIII.23.a : la contamination en PLT augmente rapidement. A 4% d'extraction, on a une contamination très faible par rapport à celle du plasma centrifugé. Ce point est positif et intéressant car il signifie que notre dispositif permet, pour certains taux d'extraction, d'obtenir un plasma appauvri en PLT (davantage que la technique classique de centrifugation). Ceci peut s'avérer utile pour certaines études spécifiques comme celle des facteurs de croissance VEGF ("vascular endothelial growth factor") qui requiert un plasma déplété en PLT. Puis, après 10% d'extraction, on retrouve la concentration en PLT obtenue pour du plasma PRP, riche en PLT. Il est donc possible de définir la concentration plaquettaire souhaitée dans le plasma extrait et d'adapter le pourcentage d'extraction à cette pureté.

- Sur la Figure VIII.23.b : la contamination en GR reste constante et très faible jusqu'au taux correspondant au rendement d'extraction (autour de 17%). La pureté du plasma extrait est donc excellente puisque inférieure aux 1% obtenus pour le plasma centrifugé. Puis après $Q^*=\eta$, comme attendu, les GR contaminent les canaux du plasma. La représentation de la contamination obtenue pour le dispositif de référence rappelle une nouvelle fois l'intérêt d'amplifier localement la zone claire avant son extraction à l'écart du flux de GR.

- La Figure VIII.23.c rassemble les données précédentes sur la contamination des GR et PLT et permet d'identifier trois grands domaines de comportement cellulaire :

- (1) une première zone, à faible taux d'extraction $< 12,5\%$, correspondant à la région au voisinage immédiat des parois du canal. C'est une zone composée de plasma seul, pauvre en PLT et pauvre en GR.

- (2) une seconde zone, délimitée par des taux d'extraction de 12,5 à 17%, correspond au voisinage proche mais non immédiat des parois. C'est une zone riche en PLT mais pauvre en GR.

- (3) la troisième zone, pour des taux d'extraction supérieurs à 17%, correspond davantage à la composition dans l'écoulement central du canal. C'est une zone riche en PLT et GR.

- Le comptage des GB en lames s'est avéré impossible. Les GB sont tout à fait visibles en fluorescence lorsqu'ils sont présents mais la forte dilution de l'échantillon ne permet d'avoir des comptages représentatifs statistiquement. Leur concentration est inférieure au seuil de détection (pureté $< 10\%$).

Pour résoudre ce problème, des premiers comptages ont été réalisés au cytomètre de flux FACSCalibur, comme expliqué dans le Chapitre 4. La Figure VIII.24 montre ces résultats préliminaires, avec en traits pleins les proportions de GB ou PLT dans le plasma extrait et en pointillés ces proportions dans le plasma centrifugé. On retrouve l'enrichissement en PLT expliqué ci-dessus (Figure VIII.24.a et b) mais il semble que la proportion en GB reste faible et inférieure à celle obtenue dans la centrifugation (Figure VIII.24.c).

Comme introduit dans le Chapitre 6, les paramètres cellulaires qui interviennent dans les intensités des forces de portance, et donc dans la distribution cellulaire, sont nombreux : dimensions, forme (sphérique pour les GB, ellipsoïde pour les GR) mais

également déformabilité, viscosité... Il devient alors difficile d'interpréter ces résultats et surtout de les prédire. Davantage d'expériences seraient nécessaires. Cela confirme aussi que, malgré leur petite taille, les PLT subissent un effet de migration latérale puisque le plasma en est dépourvu pour les plus faibles taux d'extraction.

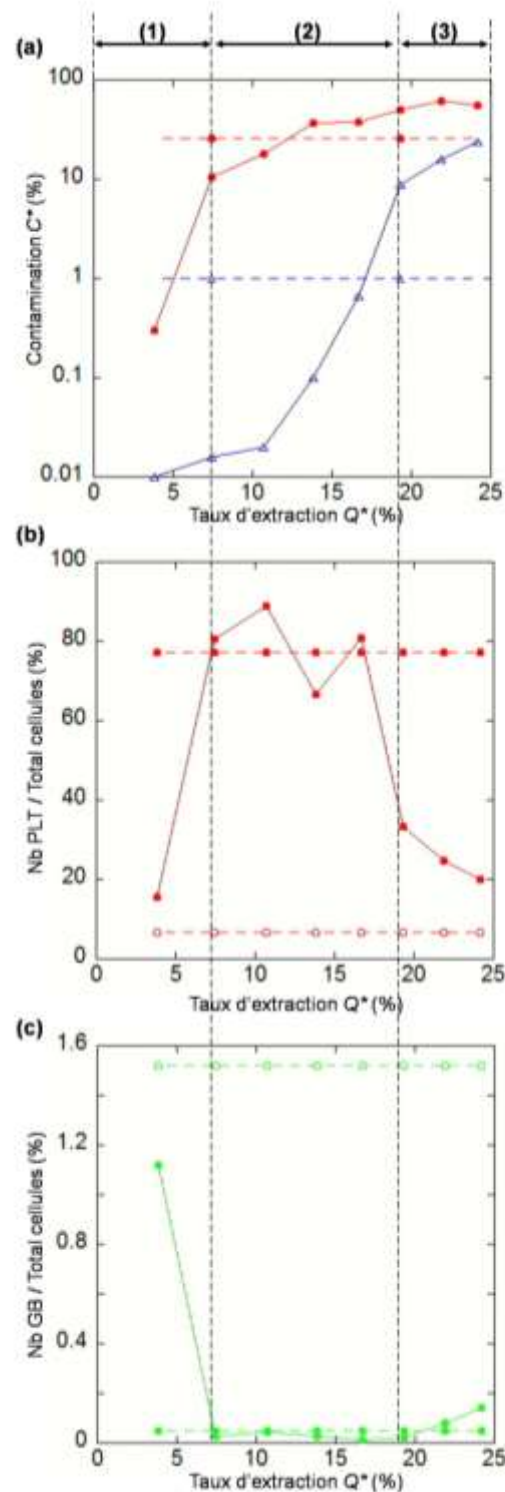


Figure VIII.24 : Mesure de la contamination cellulaire dans le plasma extrait par cytométrie en flux (FACSCalibur), comme expliqué dans le Chapitre 4. (a) Report des résultats précédents. (b) Proportion de PLT dans l'échantillon considéré. (c) Proportion de GB dans l'échantillon considéré.

F.5. Conclusion

Ainsi ces premiers tests de validation biologique ont permis de montrer que le plasma extrait par notre dispositif de microfluidique passive était de très bonne qualité, puisque les résultats obtenus furent similaires à ceux d'un plasma centrifugé. Notre dispositif et son principe de fractionnement ne semblent générer ni hémolyse, ni perte, ni dénaturation protéique.

Par la suite, en vue de l'utilisation de ce dispositif pour les différents projets analytiques du laboratoire, il faudrait enlever les protéines majoritaires du plasma extrait (comme l'albumine ou les immunoglobulines, par précipitation ou par adhésion) afin de vérifier que les différentes cibles (métabolites ou biomarqueurs suivant le projet), minoritaires, n'ont pas non plus été adsorbées.

Par ailleurs, l'étude de la contamination cellulaire a montré une excellente pureté en GR ($<< 1\%$) pour des taux d'extraction inférieurs au rendement de 17,8%. Et selon le taux d'extraction appliqué, le plasma extrait peut contenir plus ou moins de PLT qu'un plasma centrifugé. Ces résultats ouvrent des nouvelles perspectives d'analyse, comme l'étude des facteurs de croissance par exemple qui nécessite un plasma appauvri en PLT.

Par la suite, des caractérisations supplémentaires seraient à envisager pour, tout d'abord, confirmer ces résultats préliminaires. L'objectif suivant sera l'évaluation de l'effet de la déformabilité et de la taille des cellules sur les phénomènes exploités, c'est-à-dire la migration latérale et l'écoulement dans des singularités géométriques. En effet, la difficulté à visualiser l'écoulement des PLT et des GB en flux aux débits d'injection considérés rend nécessaire cette étude de la contamination pour la compréhension des phénomènes. C'est pourquoi ces caractérisations seront à mener sur des dispositifs moins complexes, comme une singularité simple (dispositifs B et C) pour avoir le seul effet des recirculations, ou avec une extraction en couche appauvrie (dispositif D) pour avoir le seul effet restriction. Il sera également intéressant de mener ces caractérisations à différents débits d'injection.

G. Conclusion et perspectives

Ainsi, ce Chapitre 8 propose des géométries originales et passives pour l'extraction du plasma en flux continu. Ces dispositifs ont été caractérisés et optimisés, avec un rendement d'extraction allant jusqu'à 17,8% pour une injection de sang dilué au 1:20, soit un enrichissement d'un facteur 3 par rapport au dispositif de référence. Le plasma extrait a également été biologiquement validé, ne montrant ni hémolyse ni perte ou dénaturation des protéines et une excellente pureté cellulaire.

Les principaux résultats de ce chapitre ont été présentés lors d'une communication orale à la conférence IEEE EMBC 2009 [SOL 09.3]. Une première publication a été soumise dans la revue Biomedical Microdevices [SOL 09.2] tandis qu'une seconde publication est prévue à plus long terme sur l'aspect microfluidique. Par ailleurs un brevet a été déposé sur cette invention [ACH 08.2].

Ces dispositifs sont fondés sur un principe fluidique purement passif, compatible avec des débits importants. Le dispositif optimal proposé est stable sur une gamme de 50 à 175 $\mu\text{L}/\text{min}$. La géométrie est simple, sans dimension restrictive comme dans le cas de la microfiltration, et ne nécessite pas de procédé complexe de fabrication. Pour toutes ces raisons, ce dispositif permet d'envisager à court terme l'intégration dans un laboratoire sur puce de cette brique d'extraction du plasma. Ce point sera abordé plus en détails dans le Chapitre 11.

Les étapes suivantes, parallèlement à l'intégration de ce premier dispositif, concerneront la mise en série ou en parallèle de plusieurs géométries afin d'éventuellement cumuler les rendements d'extraction. Une réflexion préliminaire sur la mise en série sera présentée dans le Chapitre 11. Une augmentation du rendement pourrait également être possible par un travail plus poussé sur la géométrie des cavités et sur l'angle d'ouverture de l'élargissement.

Le dispositif optimal proposé ici a été développé pour l'extraction du plasma. Mais les résultats obtenus sur la contamination dans le dispositif F apportent des premières conclusions intéressantes sur la répartition des différentes populations cellulaires dans le dispositif. Comme expliqué précédemment, des études plus approfondies seraient nécessaires sur des motifs plus simples, afin d'étudier chaque effet séparément et non leur couplage. Cette solution peut donc apporter des résultats intéressants et innovants pour le tri cellulaire par microfluidique, mais de façon hypothétique et à beaucoup plus long terme. C'est pourquoi il a été nécessaire, à plus court terme, de développer une autre solution pour le tri cellulaire. Le choix a été fait d'utiliser les compétences internes en fonctionnalisation pour mettre au point une capture spécifique sur support solide de chaque type cellulaire, GR, GB et PLT. Cette solution est développée dans les Chapitres 9 et 10.

Partie 4 : Développement de solutions fondées sur la capture par affinité

Nous avons montré dans la Partie 3, et en particulier le Chapitre 8, qu'une extraction continue du plasma est possible par microfluidique passive. Il en est tout autrement du tri cellulaire qui, comme expliqué dans le Chapitre 3, s'avère être beaucoup plus complexe. Dans cette Partie, la capture par interaction anticorps/antigène est identifiée comme une des rares techniques pouvant garantir ce tri de façon spécifique. Le laboratoire possédant des compétences propres en fonctionnalisation des surfaces silicium, la démarche proposée est d'appliquer cette capture aux différentes cellules sanguines et de montrer la faisabilité d'un tri cellulaire. A cet effet, le Chapitre 9 introduit tout d'abord les différents acteurs biologiques et le principe de la capture proposée, puis la mise au point d'un premier protocole expérimental pour permettre cette accroche. Le Chapitre 10 évalue les effets de certains paramètres du protocole établi dans le Chapitre 9, puis met en évidence ceux permettant une accroche optimale dans l'optique d'une intégration de cette capture en microsystème. C'est également dans ce but que quelques applications à cette capture sont proposées pour les trois types cellulaires considérés.

IX. Capture par affinité : Principe & Protocole

Nous avons montré dans le Chapitre 8 qu'une extraction continue du plasma était possible par microfluidique passive. Il en est tout autrement du tri cellulaire qui, comme expliqué dans le Chapitre 3, s'avère être plus complexe et nécessite généralement le couplage de différentes technologies. La capture par interaction anticorps/antigène apparaît comme une des rares techniques qui puissent garantir un tri de chaque type cellulaire de façon aussi spécifique. Cette technique a pu être développée, le laboratoire possédant des compétences propres sur la fonctionnalisation de surfaces silicium pour l'accroche d'oligonucléotides et de sucres.

La démarche proposée ici est donc d'appliquer cette capture aux différentes cellules sanguines afin d'en permettre le tri et de montrer la faisabilité de cette accroche cellulaire en utilisant ces compétences internes de fonctionnalisation.

Dans une première section, nous présentons tout d'abord une rapide bibliographie sur le principe de la capture proposée, c'est-à-dire les immunoessais et leurs applications au tri sanguin, ainsi qu'une introduction des différents acteurs biologiques. Une seconde section aborde ensuite la mise au point d'un premier protocole expérimental pour permettre cette accroche.

A. Principe

A.1. Les anticorps

Le système immunitaire détecte et neutralise les éléments étrangers grâce à des protéines complexes, les anticorps (Ac), appelés aussi immunoglobulines (Ig). Les Ac sont sécrétés par des cellules dérivant des lymphocytes B et sont localisés dans le plasma. Les Ac sont divisés en différentes classes variant par leur structure. Ce sont les immunoglobulines G (IgG) qui nous intéressent ici. Impliquées principalement dans la réponse immunitaire secondaire, ce sont les plus abondantes dans l'organisme (de 70 à 75%). Comme illustré dans la Figure IX.1, une IgG comporte quatre chaînes polypeptidiques (deux lourdes et deux légères) reliées par des ponts disulfures. Chaque chaîne comporte une partie variable, où la séquence d'acides aminés qui la constitue varie selon l'Ac, et une partie constante, où la séquence d'acides aminés est fixe pour tous les IgG. L'association d'une extrémité variable légère (VL) et d'une extrémité variable lourde (VH) constitue le paratope de l'Ac, qui est le site de reconnaissance. Chaque IgG comporte deux paratopes. Par la suite, afin de simplifier la compréhension, on utilisera abusivement l'abréviation Ac sans préciser qu'il s'agit d'une IgG.

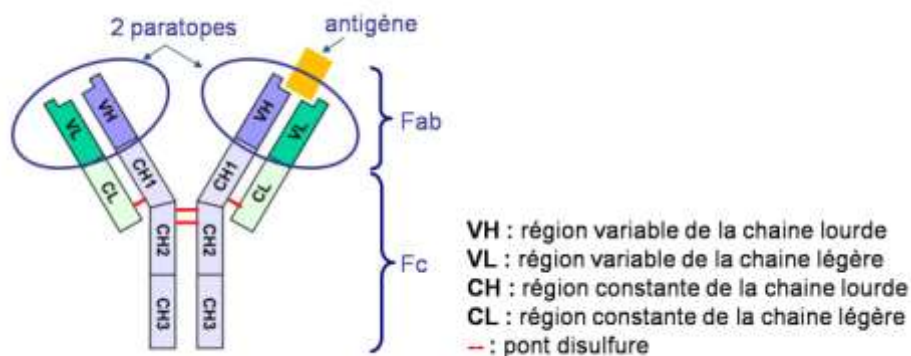


Figure IX.1 : Schéma d'une IgG qui met en évidence sa forme en Y. Les deux paratopes de l'immunoglobuline sont les régions variables de la molécule alors que les 4 chaînes polypeptidiques et les ponts disulfures forment les domaines constants de l'IgG. Fab=Fragment antigen binding. Fc=Fragment constant. Adapté de www.fr.wikipedia.org.

A.2. Les antigènes et les marqueurs phénotypiques

Les sites antigéniques reconnus par l'anticorps sont des configurations spécifiques d'acides aminés (appelées déterminants antigéniques ou épitopes) présentes à la surface de molécules comme les protéines et les acides nucléiques, ou à plus grande échelle les cellules. C'est la présence d'au moins un épitope qui fait d'une molécule un antigène. Un même antigène peut comporter plusieurs épitopes, identiques ou différents.

Les cellules sanguines sont identifiées par des marqueurs de surface qui leur sont spécifiques. Ces marqueurs sont des antigènes particuliers appelés CD (Cluster of Differentiation). Ils peuvent être spécifiques d'un type cellulaire (on les appelle alors les marqueurs de lignée) ou de différents stades de maturation (les marqueurs de différenciation). Ces antigènes sont identifiés grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques de ces récepteurs. Les antigènes de surface les plus souvent ciblés pour les cellules sanguines sont récapitulés dans le Tableau IX-1.

Type cellulaire	Antigène ciblé	Type cellulaire	Antigène ciblé
Plaquettes	CD 61	Cellules souches	CD 34
Globules rouges	CD 235a	Cellules endothéliales des vaisseaux sanguins	CD 31
Globules blancs	CD 45	Lymphocytes B	CD19
Granulocytes	CD 15	Lymphocytes T	CD 2, 3, 4, 8, 25, 28
Monocytes	CD 14		

Tableau IX-1 : Présentation des anticorps communément utilisés pour reconnaître spécifiquement les différents types cellulaires présents dans le sang total humain. Données issues de www.invitrogen.com.

En particulier, la Glycophorine A (appelée généralement CD235a) est une sialoglycoprotéine présente sur la membrane des GR. La Glycophorine est riche en acide sialique, ce qui rend hydrophile le GR et lui permet de circuler sans adhérer aux autres cellules ou aux parois des vaisseaux. L'Intégrine $\beta 3$ (appelée CD61) est un antigène présent à la surface de toutes les PLT du sang, activées ou non [ABR 90]. Elle intervient dans l'adhésion cellulaire ainsi que dans la signalisation. Le CD45 est un antigène présent sur la membrane de tous les GB humains, c'est pourquoi il appartient à la famille des LCA (Leukocytes Common Antigens). Cet antigène participe au signal de transduction en modifiant les signaux d'autres molécules surfaciques [KNA 89].

A.3. L'interaction anticorps / antigène et les immunoessais

Ces couples antigène / anticorps ont la propriété de se reconnaître et de se lier spécifiquement en associant leurs conformations complémentaires pour former un complexe immun. Les Ac utilisés au cours de ce travail sont des Ac commerciaux, monoclonaux. Un Ac monoclonal ne reconnaît qu'un seul épitope sur un Ag donné, par opposition à un Ac polyclonal qui, lui, reconnaît différents épitopes d'un même antigène.

Le principe de notre capture repose sur celui bien connu des immunoessais, qui utilisent cette interaction Ac/Ag pour détecter une multitude de molécules [GUZ 08, HEN 08] (comme par exemple les protéines [CHE 06], les hormones, les polluants ou les agents infectieux). Comme illustré sur le schéma de la Figure IX.2.a, une des molécules est immobilisée sur un support solide ; c'est le ligand, ou sonde tandis que l'autre molécule est en solution ; c'est l'analyte, ou cible. La cible entre en contact avec la surface (par diffusion, assistée ou non par brassage) et s'accroche sur la sonde. La détection de cette interaction peut se faire soit par des méthodes indirectes (qui utilisent des marqueurs tels que la radioactivité, l'activité enzymatique ou encore la fluorescence) soit, de plus en plus, par des méthodes directes (la spectrométrie de masse, les microcantilevers, les capteurs optiques à onde évanescente...) comme illustré sur la Figure IX.2.b. Les marqueurs peuvent être fixés sur l'analyte ou sur un Ac secondaire, appelé Ac de détection, qui vient s'accrocher spécifiquement sur l'analyte.

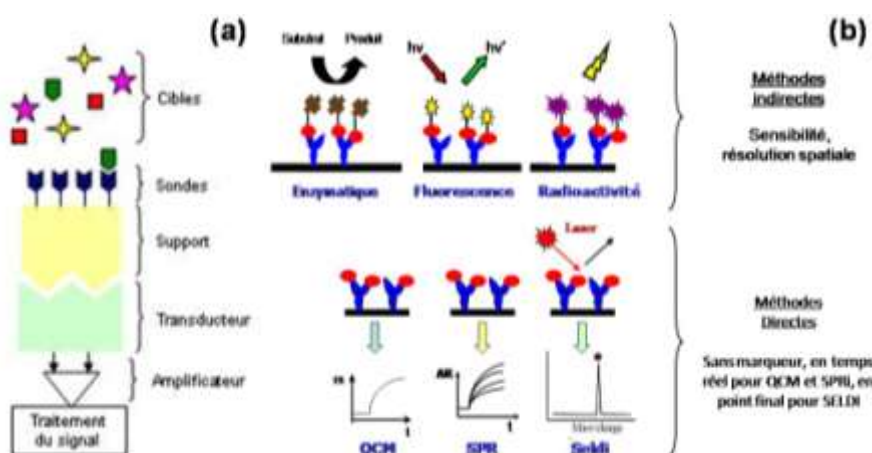


Figure IX.2 : (a) Schéma du principe d'un immunoessai. (b) Exemples de méthodes de détection. D'après [SOL 06].

A.4. Application des immunoessais au tri sanguin

La démarche présentée ici est d'appliquer le principe des immunoessais aux différentes cellules sanguines afin d'en permettre le tri. Ici, la cellule sanguine considérée constitue la cible ; elle exprime à sa surface des Ag qui lui sont spécifiques. Il est possible de greffer sur un substrat un anticorps spécifique de cet Ag. Une fois la cellule accrochée à l'endroit souhaité, un marquage secondaire permet de la visualiser, après que les cellules accrochées de façon non spécifique ont été décrochées par un rinçage. Le schéma représenté Figure IX.3 illustre ce principe de fonctionnement, ainsi que les étapes expérimentales qui lui sont nécessaires.

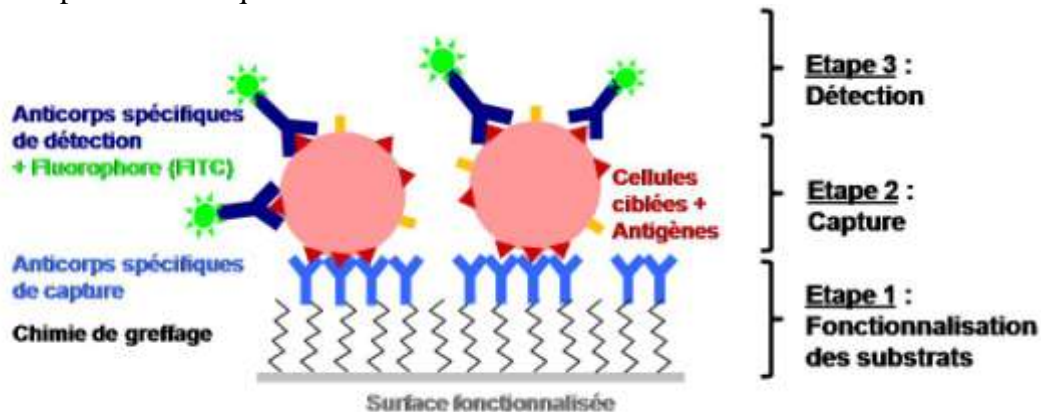


Figure IX.3 : Schéma du principe de capture d'une cellule sanguine par interaction spécifique Ac/Ag et sa détection à l'aide d'un marquage secondaire.

L'accroche des cellules sanguines par capture spécifique est une thématique en pleine expansion [PAP 07].

✓ Les applications sont multiples, mais la principale et la plus prometteuse reste la cytométrie en microsystème. En système macroscopique, la cytométrie est très utilisée mais trouve ses limites dans le nombre de fluorophores différents pouvant être utilisés en même temps. La micro-cytométrie ainsi développée permet de compter les différentes populations de GB et donc d'obtenir des numérations leucocytaires classiques [SEK 06, LYO 07] ou de les trier en flux en utilisant les différences de forces d'adhésion [CHA 05]. Elle permet également de réaliser des études multiparamétriques sur les antigènes exprimés par les lymphocytes [TAJ 09] (c'est-à-dire l'immunophénotypage) en vue du diagnostic de pathologies telles que les leucémies [BEL 03] ou le HIV [CHE 09.2].

✓ Une autre application non négligeable concerne l'utilisation des molécules d'adhésion leucocytaire, présentées dans le Chapitre 1, pour l'étude et la modélisation de la cascade d'adhésion [ORS 01, CHA 00]. L'objectif est généralement d'évaluer les constantes d'association et dissociation des différentes interactions mises en jeu afin de modéliser au mieux la réaction des GB avec les parois endothéliales.

✓ Cette accroche cellulaire tend à être intégrée en chambre à piliers pour augmenter la surface de capture. La détection de cellules rares en est facilitée, comme les cellules rares tumorales dans [NAG 07]. Une autre application est l'accroche localisée des cellules, pour une expansion clonale spécifique dans [SHA 09], ou pour les lyser et récupérer leur contenu génomique. On peut citer par exemple l'accroche des GB dans

[KOT 07], ou bien [HWA 08] où tout le protocole tri/lyse/extraction ADN est intégré en flux mais pour des bactéries.

Parallèlement, le LFCM développe des procédés chimiques de fonctionnalisation des surfaces de silicium oxydé et de verre, en particulier pour l'immobilisation d'acides nucléiques [SCH 08].

Notre objectif initial était de montrer la faisabilité d'une accroche spécifique en utilisant les compétences internes du laboratoire concernant la fonctionnalisation sur puces silicium. Pour cela, la première étape est de montrer la faisabilité de cette accroche dans un cas simple : en régime semi-statique, avec une incubation sur une simple lame fonctionnalisée. Le chapitre B présente la mise au point d'un protocole pour permettre cette accroche tandis que le chapitre C propose quelques optimisations à ce protocole afin d'améliorer l'accroche obtenue.

B. Protocole expérimental

Le protocole expérimental décrit ci-dessous est une version déjà optimisée qui sera discutée plus en détails par la suite.

B.1. Fonctionnalisation des substrats

B.1.1. Protocole chimique de greffage

Les substrats - des lames de verre ou de silicium recouvert d'une couche d'oxyde* - sont traités avec différents protocoles chimiques de fonctionnalisation par silanisation. Au cours de ce travail, trois protocoles de fonctionnalisation différents mis en place par le laboratoire LFCM ont été retenus pour le dépôt d'anticorps dédiés à la capture de cellules sanguines. On distingue le protocole CEA2, le protocole EPF et le protocole FDTs. Ces trois protocoles sont présentés ici plus en détail. Cette fonctionnalisation est réalisée dans la salle blanche du BHT, par Guillaume Nonglaton, Caroline Fontelaye et Guillaume Costa.

Protocole CEA2

Le protocole CEA2, dont les étapes sont présentées dans la Figure IX.4, a été mis au point en interne pour l'immobilisation d'acides nucléiques modifiés par une fonction amine (NH_2) [SCH 08, VIN 02]. Mais il peut également servir pour d'autres biomolécules ayant des fonctions amines en surface, comme les anticorps. Depuis le début de ce travail, ce protocole chimique a également été utilisé en interne pour l'accroche d'oligonucléotides et de bactéries.

* A noter que les résultats de capture sont identiques que l'expérience se fasse sur un substrat verre ou sur un substrat SiO_2 .

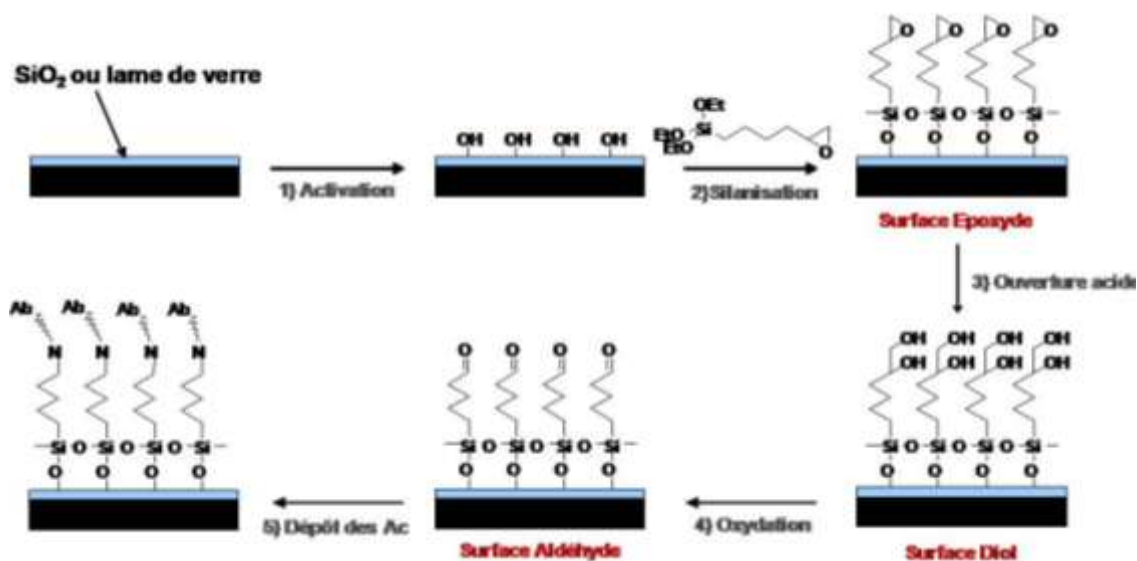


Figure IX.4 : Protocole de silanisation CEA.

La première étape de ce procédé consiste à activer la surface des substrats par un trempage dans un mélange de soude et d'éthanol (Etape 1). Puis les groupements silanols (Si-OH) qui se trouvent en surface des substrats ainsi activés peuvent alors réagir avec un silane ayant une fonction époxyde (Etape 2). Cet hétérocycle est ensuite rapidement ouvert en milieu acide afin d'obtenir une fonction diol qui s'avère plus stable (Etape 3). Celle-ci est finalement oxydée (Etape 4), juste avant le dépôt des anticorps (Etape 5), sous la forme d'une **fonction aldéhyde** capable de réagir avec les fonctions amines des anticorps déposés. Cette silanisation permet une accroche covalente de l'Ac sur la surface. Un protocole plus détaillé est disponible dans [SCH 08]. Ce protocole chimique est tel que l'angle de mouillage d'une goutte d'eau sur une plaque de silicium ainsi fonctionnalisée est de 41° .

Protocole EPF

Le protocole EPF, représenté sur la Figure IX.5, a été récemment mis au point pour l'immobilisation des anticorps. Ce protocole est fondé sur l'utilisation d'un silane commercial (Sikemia) et permet d'immobiliser les anticorps par adsorption, c'est-à-dire par interaction non covalente, et sans dénaturer les anticorps. C'est pourquoi, depuis le début de ce travail, cette silanisation est utilisée en vue de l'accroche d'antigènes et de bactéries.

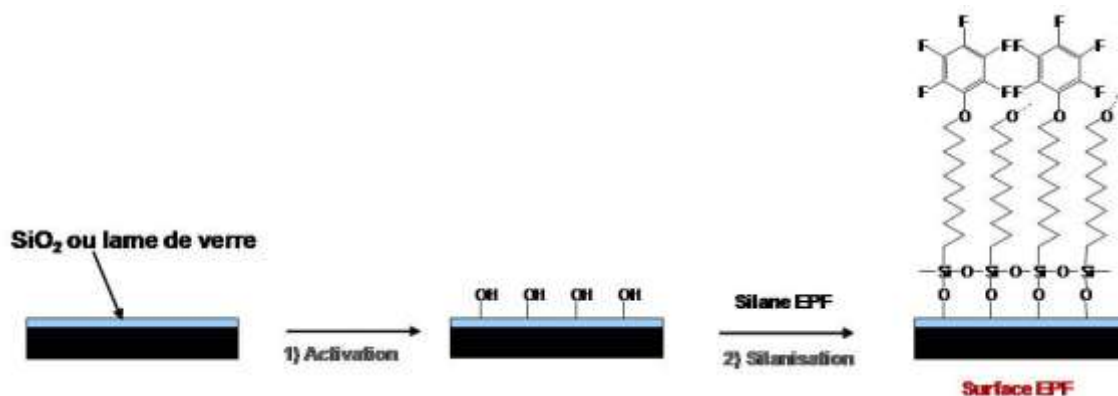


Figure IX.5 : Protocole de silanisation EPF.

Une étape préliminaire d'activation des substrats est réalisée comme expliqué dans la section précédente (Etape 1). Les groupements Si-OH en surface peuvent alors réagir avec le silane EPF, caractérisé par une fonction étherpentafluorée sur laquelle s'accrochent les anticorps. Ce protocole chimique est tel que l'angle de mouillage d'une goutte d'eau sur une plaque de silicium ainsi fonctionnalisée est de 95°.

Protocole FDTS

Le protocole FDTS, représenté Figure IX.6, a été mis au point pour le revêtement hydrophobe de surface mais nous avons souhaité le tester pour l'immobilisation d'anticorps. Ce protocole est fondé sur l'utilisation d'un silane commercial (Aber).

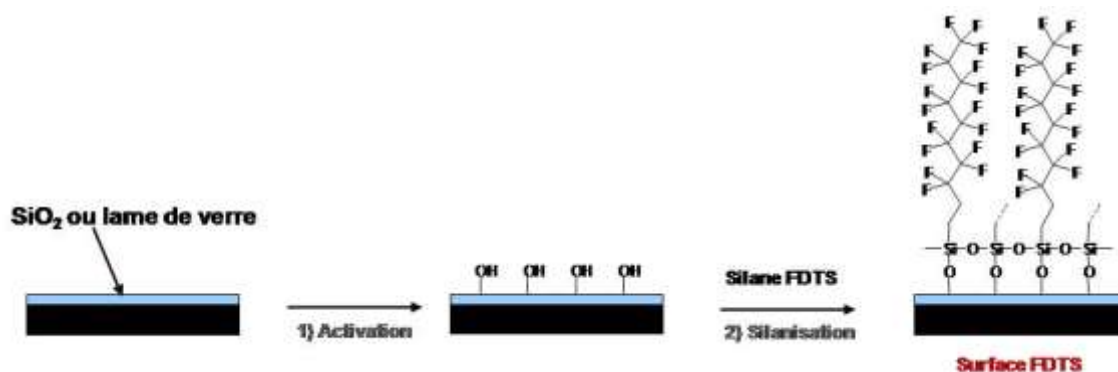


Figure IX.6 : Protocole de silanisation FDTS.

Comme dans le cas précédent, une étape préliminaire d'activation des substrats permet de libérer les groupements Si-OH en surface, qui peuvent ensuite réagir avec le silane FDTS caractérisé par une fonction perfluorée. Ce protocole chimique est tel que l'angle de mouillage d'une goutte d'eau sur une plaque de silicium ainsi fonctionnalisée est de 108°.

B.1.2. Greffage des sondes

Les solutions d'anticorps sont déposées manuellement sur la surface, en gouttes de 0,5µL à l'aide d'une micropipette ($\varnothing_{Plot}=1\text{mm}$), sans filtration au préalable. Les sondes peuvent éventuellement être diluées avec du PBS 1X avant le dépôt. Dans la majorité des plans de greffage, chaque solution de sondes est déposée en duplicata. Par ailleurs, des plots PBS et plots témoins, dirigés contre des cellules différentes des cellules d'intérêt, sont systématiquement préparés comme contrôles négatifs.

Les lames sont ensuite laissées à incuber une nuit, à 4°C, sous argon et dans l'obscurité afin de ne pas dénaturer les Ac et de préserver le fluorophore. C'est l'étape d'**immobilisation des sondes**. Une étape de **saturation du substrat** est ensuite nécessaire afin d'éviter que la surface fonctionnalisée n'ayant pas réagi avec les anticorps ne vienne interagir avec les cellules. Pour cela, une solution de PBS 1X contenant des protéines de lait est pulvérisée sur les substrats fonctionnalisés (PBS Régilait 3%, nébuliseur, 1h). Des étapes de **rinçage** et de séchage permettent d'achever la préparation des lames : 1/ premier rinçage (PBS Régilait 3% Tween 0,1%, agitation orbitale, 5 min), 2/ deuxième rinçage (EDI, agitation orbitale, 30sec), puis 3/

séchage (600tr/min, 6min). Jusqu'à leur utilisation, les lames sont stockées (4°C, sous argon) à l'obscurité.

Type cellulaire	Ac	Marque	Clone	[Ac]
Plaquettes	CD61 FITC	Invitrogen	F11	0,2mg/mL
	CD61 FITC	BD	VIPL2	0,5mg/mL
	CD61	BD	VIPL2	0,5mg/mL
	CD41 FITC	BD	HIP8	0,5mg/mL
Globules blancs	CD45 FITC	Invitrogen	HI30	0,2mg/mL
	CD45 FITC	BD	HI30	0,5mg/mL
	CD45	BD	HI30	0,5mg/mL
Globules rouges	CD235a FITC	Invitrogen	CLB-ery-1 AME-1	0,2mg/mL
	CD235a FITC	BD	GA-R2 HIR 2	0,5mg/mL
	CD235a	BD	GA-R2 HIR 2	0,5mg/mL

Tableau IX-2 : Détail des différents anticorps greffés au cours de ce travail, de leur marque et des clones considérés. Fluorophore=FITC.

Les Ac sont actuellement déposés manuellement, ce qui pose un problème de reproductibilité des plots (taille et densité surfacique). Pour résoudre ce problème, des essais ont été réalisés afin de faire ce dépôt à l'aide d'un spotteur automatique (BioChip Arrayer, Packard Instrument, $\varnothing_{Plot}=180\mu m$). Quelque soit le type cellulaire ciblé, ces plots n'accrochent aucune cellule. Ce problème a été retrouvé à l'identique sur d'autres couples Ac/Ag, ciblés pour la capture de bactéries, et habituellement efficaces avec un dépôt manuel. Deux explications sont possibles et seraient à tester : (1) nos Ac peuvent s'accrocher non spécifiquement sur l'aiguille, ou (2) nos Ac peuvent être dénaturés par le système d'éjection de la goutte. En effet le relargage du volume se fait par un dispositif piézoélectrique qui utilise une charge électrique (environ de 100V). Les molécules d'Ac peuvent ainsi avoir leur structure altérée, être dénaturées, et se révéler non fonctionnelles.

B.2. Echantillons

L'étude menée ici a pour but de mettre en évidence une accroche spécifique, de l'optimiser et de la quantifier. Il est donc souhaitable d'avoir une accroche claire et bien visible. C'est pour cela que des expériences préliminaires (données non montrées) ont été au préalable réalisées sur des solutions modèles, c'est-à-dire des échantillons enrichis en PLT, GR ou GB respectivement, et dilués avec du PBS (= suspension cellulaire pure dans du PBS). Les résultats positifs obtenus nous ont permis de passer progressivement à des échantillons enrichis mais dilués avec du plasma pour avoir l'effet des protéines (= suspension cellulaire pure de composition équivalente au sang, avec protéines, sucres, lipides...), puis à du sang total non dilué directement pour les GR et les PLT. Comme le sang total contient très peu de GB (5.10^3 GB/ μL par rapport à 5.10^6 GR/ μL et 250.10^3 PLT/ μL), nous sommes pour l'instant restés au buffy-coat pour les GB. Bien évidemment l'étape du sang total sera une perspective à court terme une fois que l'accroche aura été optimisée.

Par conséquent, pour l'accroche des PLT et des GR, l'échantillon considéré consiste directement en du sang humain, total et non dilué. Pour l'accroche des GB, il s'agit d'un

échantillon de plasma largement enrichi en GB, le buffy coat, préparé conformément au protocole décrit dans le Chapitre 4.

B.3. Incubation et rinçage

B.3.1. Incubation des cibles

Les expériences préliminaires étaient réalisées en cuve, c'est-à-dire que toute la lame était immergée dans l'échantillon sanguin. L'utilisation d'un GeneFrame^{*} a permis de fortement réduire le volume d'échantillon nécessaire (5mL versus 200µL), et cela à rendements d'accroche visuellement comparables. De plus, ces expériences sont réalisées dans des conditions plus confinées.

Dans l'ensemble des expériences présentées ici, l'échantillon est déposé à la pipette dans une chambre délimitée par un GeneFrame. Le volume déposé est de 200µL pour un GeneFrame de 15x15mm. L'incubation est de 45min, à température ambiante (25°C) et dans l'obscurité. Une agitation orbitale à 100rpm de l'ensemble permet d'assurer un brassage du milieu réactionnel et d'augmenter la probabilité d'interaction.

B.3.2. Rinçage de l'accroche non spécifique.

Il est nécessaire, avant le marquage secondaire, de bien rincer la lame et d'enlever les cellules fixées de façon non spécifique. Le tampon de rinçage (PBS 1X) doit être mis au préalable à température ambiante, au risque de faire éclater les GR. Différents protocoles de rinçage ont été testés (à l'aide de bains, avec ou sans agitation) et apportent des résultats fortement variables. Dans l'ensemble des expériences présentées ici, la méthode de rinçage utilisée est la suivante : la lame est posée sur la paillasse et penchée selon sa tranche la plus longue d'un angle d'environ 45°. A l'aide d'une pipette, on verse 200µL de PBS sur la lame, de haut en bas, afin que le PBS entraîne avec lui les cellules non fixées sur la lame. Ce protocole est réitéré 6 fois.

B.4. Détection

Pour chaque type cellulaire, l'anticorps de marquage a été choisi parmi différents clones et différentes marques, comme étant celui donnant le meilleur signal de fluorescence en volume, c'est-à-dire le rapport signal/bruit le plus élevé. Parmi les trois Ac FITC anti-PLT, les deux Ac FITC anti-GB et les deux Ac FITC anti-GR, le meilleur Ac sélectionné pour chaque type cellulaire est le suivant :

- l'anti-CD45, couplé FITC, à 0,5mg/mL de BD pour les GB,
- l'anti-CD61, couplé FITC, à 0,5mg/mL de BD pour les PLT,
- l'anti-CD235a, couplé FITC, à 0,2mg/mL de Caltag/Invitrogen pour les GR.

50µL d'anticorps de marquage couplés FITC sont déposés dans la chambre, incubés 15 minutes, à température ambiante et dans l'obscurité. La lame est ensuite rincée avec du PBS afin d'éliminer l'excès d'Ac marqués non fixés de manière spécifique sur les

^{*} Un GeneFrame est une couronne rectangulaire autocollante que l'on colle sur la lame afin de délimiter la zone greffée et d'y définir un volume d'incubation.

cellules. Du PBS déposé dans la chambre (100µL) permet de garder les cellules hydratées afin d'éviter leur lyse lors de l'observation au microscope. Les plots sont observés en fluorescence, à différents grossissements.

B.5. Analyse d'images

Deux façons d'analyser les données obtenues ont été utilisées. La première est une méthode qualitative, c'est-à-dire définie par une évaluation purement visuelle. Elle tient compte de la densité de l'accroche sur le plot mais également de celle, non spécifique, en dehors des plots. Cette méthode a des limites évidentes de sensibilité mais a été largement suffisante pour la plupart des expériences préliminaires.

Par la suite, une fois que le protocole est devenu assez reproductible et donne une accroche répétable, les variations d'accroche sont difficilement quantifiables à l'œil nu. C'est pourquoi une seconde méthode d'analyse, quantitative, peut être envisagée avec la définition d'une accroche différentielle. Le principe est expliqué dans la Figure IX.7. Ces mesures sont réalisées à partir de photographies prises au grossissement 5X afin de visualiser l'ensemble du plot.

- Pour l'accroche des GR et des PLT, la méthode utilisée est la même (Figure IX.7.a). On mesure à l'aide du logiciel ImageJ l'intensité moyenne de fluorescence sur le plot, ainsi que dans deux régions d'intérêt définies à l'extérieur du plot. L'intensité différentielle ΔI_{PLT} (ou ΔI_{GR}) est alors définie comme l'écart entre le signal $I(PLT)$ et le bruit hors plot (moyenne de $I(\emptyset)_1$ et $I(\emptyset)_2$).

$$\Delta I_{PLT} = I(PLT) - moy\{I(\phi)_1; I(\phi)_2\} ; \Delta I_{GR} = I(GR) - moy\{I(\phi)_1; I(\phi)_2\} \quad (IX-1)$$

- Dans le cas des GB, l'accroche n'est pas suffisante pour permettre une analyse d'intensité moyenne ; les GB sont comptés un par un (Figure IX.7.b). L'intensité d'accroche différentielle ΔI_{GB} est alors définie comme l'écart entre le nombre de GB accrochés sur le plot $N_{GB}(plot)$ et le nombre de GB accrochés hors plot $N_{GB}(\emptyset)$ mais sur une surface équivalente.

$$\Delta I_{GB} = N_{GB}(plot) - N_{GB}(\phi) \quad (IX-2)$$

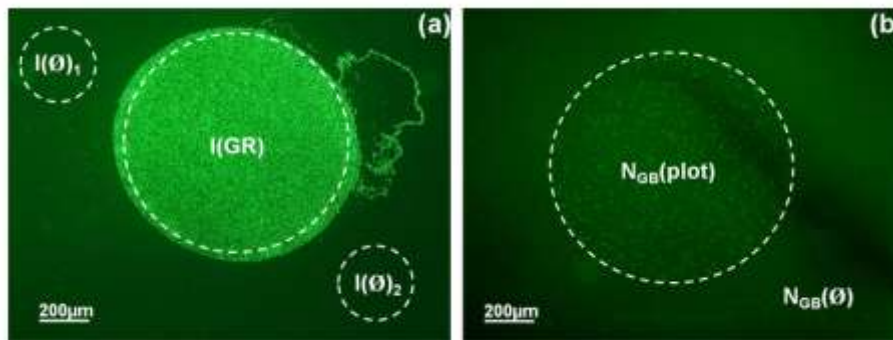


Figure IX.7 : Méthode d'analyse quantitative de l'accroche à partir de photographies prises au grossissement 5X. (a) Méthode par mesure de l'intensité moyenne pour l'accroche des GR et des PLT. Exemple d'un plot de GR, avec $I(GR)$, $I(\emptyset)_1$ et $I(\emptyset)_2$ les intensités moyennes mesurées respectivement sur le plot et dans les zones 1 et 2 en dehors des plots. (b) Méthode par comptage pour l'accroche des GB. Exemple d'un plot de GB, avec $N_{GB}(plot)$ et $N_{GB}(\emptyset)$ les comptages mesurés respectivement sur le plot et en dehors du plot.

X. Capture par affinité : Résultats & Applications

Une grande partie du travail présenté dans le Chapitre 9 a concerné la mise au point d'un protocole expérimental reproductible. Une fois ce protocole de référence déterminé, nous en avons fait varier certains paramètres afin d'en évaluer l'effet. Citons par exemple le choix du couplage « protocole de fonctionnalisation/sondes » ou encore la température et le temps d'incubation. La finalité de ce Chapitre 10 est de mettre en évidence ces paramètres permettant une accroche optimale, toujours avec la perspective d'une intégration en microsystème. Dans ce but, ce chapitre présente également, pour les trois types cellulaires considérés, quelques applications microsystème potentielles pour la capture spécifique mise en évidence.

A. Optimisation du protocole expérimental et quantification

A.1. Influence de la fonctionnalisation

La première étape consiste à choisir la fonctionnalisation optimale pour chacun des trois types cellulaires, c'est-à-dire le couple protocole chimique de greffage / sonde qui permettra la meilleure accroche.

Pour cela, les trois protocoles chimiques de surface CEA2, EPF et FDTs ont été testés comparativement, avec des incubations exactement identiques (mêmes échantillons sanguins et mêmes conditions expérimentales) et simultanées. Pour chaque protocole chimique, différents Ac d'accroche ont été testés afin de mettre en évidence l'Ac optimal et d'étudier l'effet de la présence ou non d'un fluorophore couplé à l'Ac. Le choix s'est fait par analyse qualitative.

Les accroches testées sont présentées dans le tableau de la Figure X.1.a, et les résultats sont illustrés dans les Figure X.1.b à j :

✓ Quelle que soit la cellule ciblée et l'Ac utilisé, le protocole FDTs rend impossible toute incubation d'échantillon. En effet, la surface ainsi silanisée est tellement hydrophobe que l'échantillon sanguin ne reste pas sur la zone greffée. Une incubation homogène est totalement impossible.

✓ Accroche des GR : Quel que soit le protocole et qu'ils soient de la marque BD ou Invitrogen, les Ac CD235a-FITC ne permettent pas une rétention efficace de GR sur la surface de la lame, avec une accroche quasi nulle (b). L'Ac qui donne une bonne accroche est le CD235a purifié de BD. Avec cet Ac, l'accroche est positive à la fois

pour les protocoles CEA2 (c) et EPF (d), avec cependant une densité de cellules observées plus forte pour le protocole EPF.

✓ Accroche des GB : Comme pour les GR précédemment, les CD45-FITC de BD et Invitrogen semblent ne rien accrocher une fois greffés en surface (e). Seul le CD45 purifié de BD permet d'obtenir une accroche positive (f, g), avec une densité également meilleure pour le protocole EPF par rapport à CEA2.

✓ Accroche des PLT : Les CD61-FITC n'accrochent pas de PLT, quel que soit le protocole chimique. Par contre le CD61 purifié (h, i) ainsi que le CD41-FITC (j) permettent une accroche positive et forte. La densité est encore une fois meilleure avec l'EPF mais c'est surtout la spécificité de la rétention cellulaire qui justifie le choix de l'EPF ici. En effet, il est clairement visible sur la Figure X.1.(h) qu'un nombre important de PLT se trouve en dehors du plot de capture spécifique lorsqu'on utilise le protocole CEA2.

Les différentes conclusions que l'on peut tirer de cette série d'expériences sont les suivantes :

✓ Avant tout, les protocoles de fonctionnalisation CEA2 et EPF dont nous disposons dans le laboratoire sont compatibles avec une accroche cellulaire. L'accroche obtenue semble forte et robuste.

✓ Tout d'abord, il semble que la présence d'un fluorophore sur l'anticorps gêne l'accroche des cellules, du moins dans le cas des couples Ac/Ag considérés ici. En effet, pour chaque Ac BD, l'Ac purifié et l'Ac FITC sont issus du même clone et sont dans le même tampon, à la même concentration. Il faudrait pouvoir connaître la localisation du fluorophore sur l'anticorps pour expliquer ces résultats, la justification la plus probable étant l'encombrement stérique. Mais le fluorophore peut également empêcher le greffage de l'Ac sur la surface silanisée.

✓ Par ailleurs, le type de silane utilisé a clairement son importance. Un silane trop hydrophobe (FDTS) empêche la bonne incubation de l'échantillon biologique sur la zone d'intérêt tandis qu'un silane trop hydrophile semble induire de l'accroche non spécifique (CEA2). Cette influence de l'hydrophobicité mériterait d'être approfondie par davantage d'expériences pour être confirmée.

Il est important de préciser que toutes ces remarques restent néanmoins des hypothèses car les informations dont nous disposons sont minimales. Malgré ces inconnues, la faisabilité d'une accroche en régime statique a été mise en évidence pour les trois types cellulaires considérés, à partir de sang total pour les GR et les PLT, à partir de buffy coat pour les GB. La fonctionnalisation permettant une accroche optimale est similaire pour les trois populations cellulaires, à savoir la silanisation EPF couplée aux anticorps purifiés de BD (CD235a, CD61 et CD45 à 0,5mg/mL). L'étape suivante est de vérifier que cette accroche est bien spécifique.

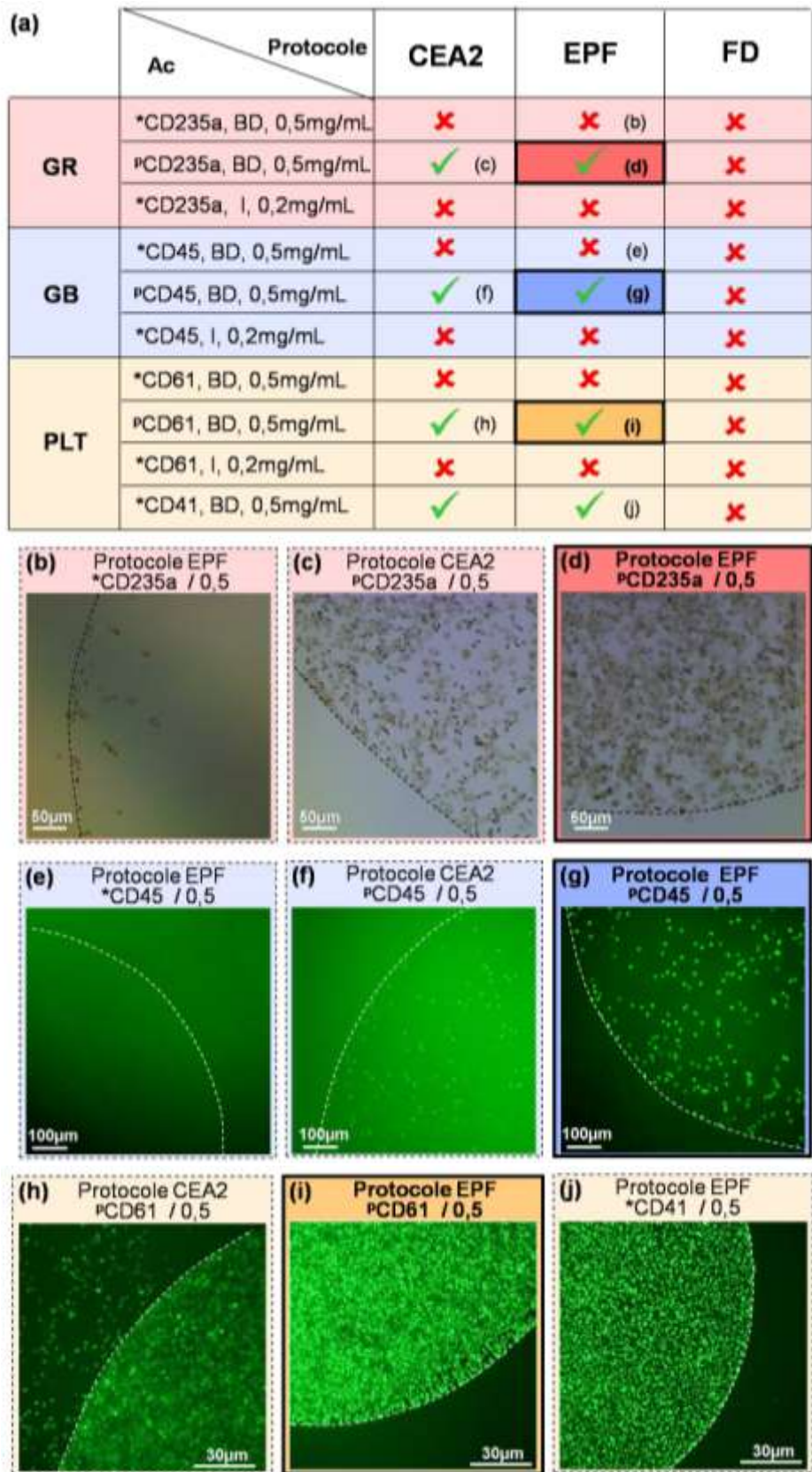


Figure X.1 : Etude de la fonctionnalisation optimale, c'est-à-dire du couple protocole chimique de greffage et sondes greffées. (a) Tableau récapitulatif. (b, c, d) Photographies obtenues pour l'accroche des GR. (e, f, g) Photographies obtenues pour l'accroche des GB. (h, i, j) Photographies obtenues pour l'accroche des PLT. *Ac et ^pAc correspondent respectivement à des anticorps couplés à un fluorophore FITC et à des anticorps purifiés. BD et I représentent la marque des anticorps testés, à savoir BD Biosciences ou Invitrogen.

A.2. Etude de la spécificité de l'accroche

L'étape suivante concerne l'étude de la spécificité de l'accroche cellulaire. Il est en effet nécessaire de vérifier que la cellule cible ne s'accroche ni sur les plots de contrôle ni en dehors des plots, mais également qu'il n'y pas d'autres types cellulaires qui s'accrochent sur les plots des cibles. Comme précédemment, cette étude se fait de manière qualitative.

Cette étude a été réalisée sur le couple optimal protocole chimique / Ac mis en évidence précédemment, à savoir le protocole EPF et les anticorps BD purifiés. Afin de visualiser rapidement la répartition des cellules, les PLT et les GB sont marqués en fluorescence au CD61-FITC et CD45-FITC tandis que les GR peuvent être directement observés sans marquage secondaire en lumière blanche.

La Figure X.2.a récapitule les différents résultats obtenus. Aucun GR n'est visible en dehors des plots anti-GR (Figure X.2.b et d). Cette accroche est donc tout à fait spécifique. Les GR visualisés en dehors des plots correspondent à des GR en volume, non fixés. En effet on peut voir ces cellules se déplacer très lentement, par opposition aux cellules fixées qui, elles, ne bougent pas pendant le temps que dure l'observation. De manière similaire, les GB s'accrochent uniquement sur les plots qui les concernent. L'accroche des GB est donc également spécifique. Les PLT, quant à elles, ne s'accrochent ni en dehors des plots ni sur les plots anti-GB. En revanche, quelques PLT sont accrochées de façon non spécifique sur les plots anti-GR (Figure X.2.c et e). Selon l'application ciblée, ce problème sera discuté par la suite.

Pour conclure, mise à part une faible accroche de PLT détectée sur les plots anti-GR, la solution proposée d'accroche cellulaire par affinité semble spécifique pour les trois types cellulaires considérés.

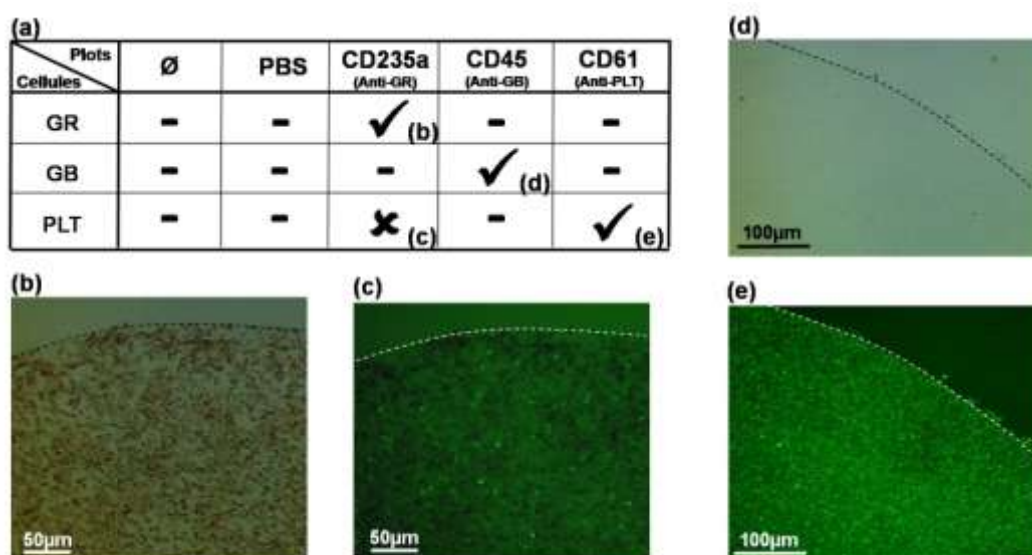


Figure X.2 : Etude de la spécificité de l'accroche cellulaire, pour le couplage optimal protocole chimique EPF & Ac purifiés. (a) Tableau bilan des résultats obtenus. (b, c) Photographies illustrant la présence de GR (à gauche) et de PLT (à droite) sur les plots anti-GR. (d, e) Photographies illustrant l'absence de GR (en haut) et la présence de PLT (en bas) sur les plots anti-PLT.

A.3. Influence de la concentration en sondes

En vue d'une optimisation du protocole précédent, il est nécessaire d'évaluer l'effet de la concentration en sondes sur l'accroche obtenue. Cela permet de vérifier que les plots de sondes garantissent une gamme dynamique suffisante pour les cellules que l'on veut doser. Cette étude a été réalisée sur les PLT et analysée à l'aide de la méthode d'analyse quantitative expliquée précédemment.

Dans ce but, des lames ont été fonctionnalisées avec des plots d'Ac aux concentrations variant de 0,005 à 0,5mg/mL. Cette expérience a été réalisée sur deux échantillons de sang différents, avec des concentrations plaquettaires de $204 \cdot 10^3$ et $334 \cdot 10^3$ PLT/ μ L. Ces échantillons sont utilisés directement, sans traitement particulier et sans dilution. Pour chaque échantillon le plan de greffage est le même, avec des plots de contrôle (PBS, anti-GR et anti-GB) et des plots en Ac aux concentrations variant de 0,005 à 0,5mg/mL. Le graphique de la Figure X.3.a représente l'accroche en fonction de la concentration en Ac tandis que les plots obtenus sont représentés dans les photographies de la Figure X.3.b.

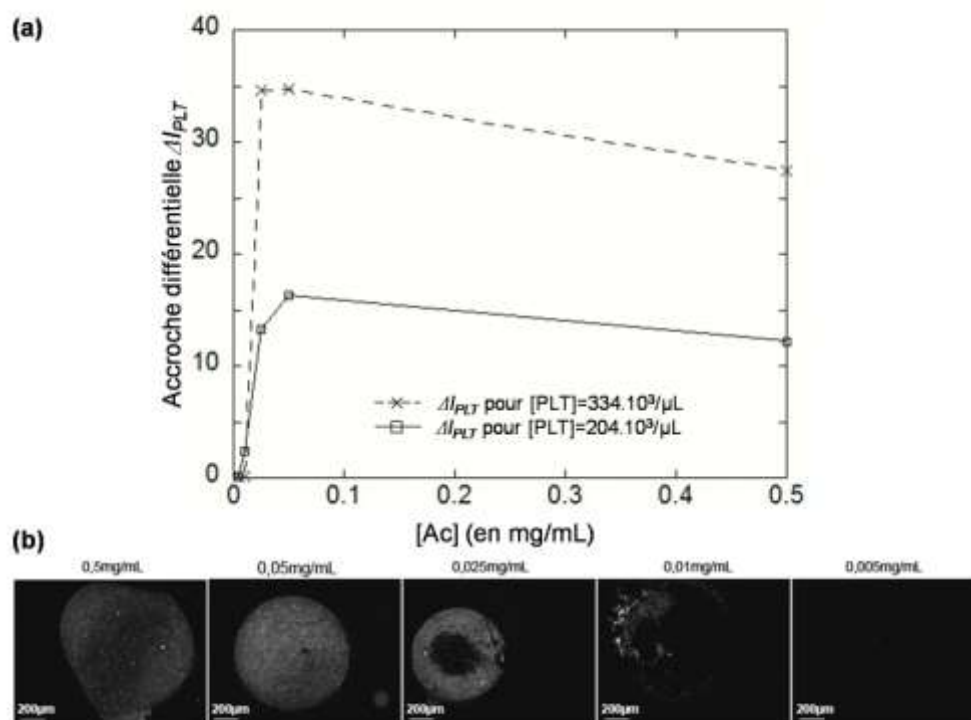


Figure X.3 : Effet de la concentration en sondes. (a) Accroche plaquettaire obtenue en fonction de la concentration en Ac, pour deux échantillons sanguins à 204 et $334 \cdot 10^3$ PLT/ μ L. (b) Photographies des plots obtenus pour $204 \cdot 10^3$ PLT/ μ L.

Pour des concentrations en sondes de 0 à 0,05mg/mL, l'accroche des PLT augmente progressivement. Elle diminue ensuite légèrement à 0,5mg/mL. Les trois concentrations donnant une accroche positive sont donc 0,025mg/mL, 0,05mg/mL et 0,5mg/mL, avec une accroche optimale à 0,05mg/mL. En deçà de ces concentrations, l'accroche est quasi nulle. Les plots 0,5 et 0,025 donnent un signal similaire mais l'accroche est plus homogène à 0,5. En effet, comme illustré dans la Figure X.3.b, on constate à 0,025 que l'accroche se fait sur la couronne périphérique du plot. Ce phénomène, qui correspond à une inhomogénéité de la répartition des Ac sur la surface du plot, a déjà été observé et

étudié dans le laboratoire [DEL 08]. Cette répartition hétérogène des Ac a lieu lors de l'évaporation de la goutte (et du tampon salin qu'elle contient) après son dépôt. Les solutions pour limiter ce problème sont de diminuer l'évaporation ou de modifier la composition du tampon (sel, pH...).

Ainsi il a été confirmé expérimentalement l'idée selon laquelle l'accroche variait en fonction de la concentration en sondes. L'accroche est positive et homogène pour des plots d'Ac à 0,5 et 0,05mg/mL avec un optimal à 0,05. Les expériences suivantes se feront néanmoins à 0,5mg/mL pour des questions de stabilité des solutions. En effet il est connu que les protéines diluées s'avèrent moins stables car elles se dégradent plus facilement. Par la suite, en vue d'une intégration de cette capture en microsystème et d'une réduction des coûts, une étude plus approfondie sur cet effet de concentration des sondes sera à envisager. Le but en sera de diluer au mieux les solutions initiales d'Ac afin d'avoir le meilleur signal à un coût raisonnable.

A.4. Influence de la température et du temps d'incubation

Dans la perspective d'une intégration en microsystème, les paramètres « température » et « temps d'incubation » sont essentiels, surtout à la lecture des protocoles commerciaux tels que ceux des billes fonctionnalisées Dynabeads (www.invitrogen.com/dynal), qui conseillent très fortement une incubation sur glace (de 2 à 8°C) et avec un contrôle très précis de la durée (20 à 30min selon le type de cellules et d'isolation). C'est pour cela que l'influence de ces deux paramètres sur l'accroche doit être étudiée et optimisée, à l'aide ici d'une analyse quantitative.

A.4.1. Effet de la température

Trois températures ont été testées et appliquées au protocole complet (incubation de l'échantillon et marquage secondaire) : 4°C, température ambiante (25°C) et 37°C. Pour cela, l'ensemble du banc expérimental est placé respectivement au réfrigérateur, sur la paillasse et à l'étuve. Cet effet a été étudié sur les trois types cellulaires.

La Figure X.4 illustre l'influence de la température sur l'efficacité d'accroche. Pour cela, on représente l'intensité différentielle (ΔI_{PLT} et ΔI_{GR} dans la Figure X.4.a et ΔI_{GB} dans la Figure X.4.b) en fonction de la température. Il apparaît clairement que l'accroche évolue en fonction de la température d'incubation, quel que soit le type cellulaire. Pour les PLT, cette intensité est relativement constante à 4 et 25°C mais chute à 37°C. La tendance est similaire pour les GR, avec un écart-type important qui s'explique par le fait que l'accroche des GR semble trop dense ; les plots sont saturés et plus assez sensibles. Cependant l'accroche y est toujours positive et très forte, quelle que soit la température. Pour les GB, l'accroche est très faible à 4 et 37°C mais importante à 25°C. Pour les trois types cellulaires considérés, la température ambiante semble donc être une température tout à fait adaptée.

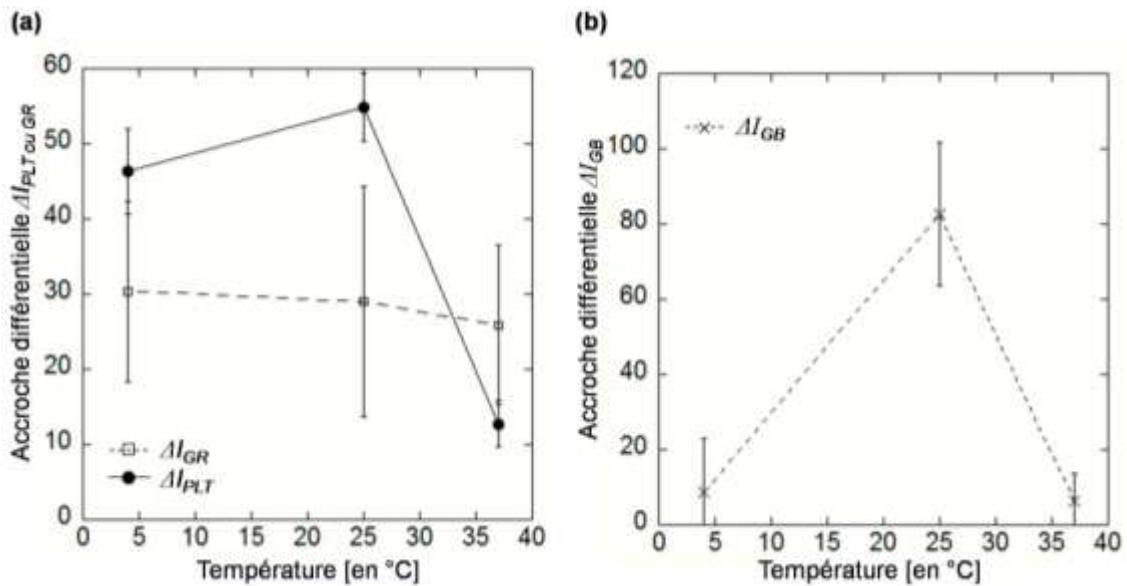


Figure X.4 : Optimisation du protocole de capture et effet de la température d'incubation sur l'accroche des cellules. (a) Accroche des GR, moyennée sur 5 plots, et des PLT, moyennée sur 3 plots. (b) Accroche des GB, moyennée sur 3 plots.

Ainsi la température ambiante semble être la température donnant une accroche optimale pour les trois types cellulaires. Ce point est très intéressant car il montre qu'il est possible d'intégrer cette accroche en microsystème à température ambiante. Par conséquent, il ne sera pas nécessaire d'intégrer d'élément Peltier pour chauffer ou refroidir la chambre d'incubation où se déroulera la capture des cellules par les anticorps.

A.4.2. Effet du temps d'incubation

Cet effet a été étudié sur les PLT et sur les GR. En effet, nous avons commencé par les deux types cellulaires qui donnaient l'accroche la plus forte. Les GB étant moins nombreux, l'expérience est plus complexe et n'a pu encore être réalisée.

Pour cela, un même échantillon sanguin est mis à incuber à cinq temps d'incubation différents : 5, 15, 30, 45 et 90min, avec un marquage secondaire toujours égal à 15min. L'analyse de l'accroche se fait de manière quantitative, comme expliqué dans le protocole précédent.

La Figure X.5 représente l'accroche des cellules en fonction du temps d'incubation. L'évolution temporelle obtenue est similaire pour GR et PLT mais de façon plus marquée pour les PLT. L'accroche apparaît dès 5min d'incubation, augmente jusqu'à 30min, puis se stabilise de 30 à 90min. Ces résultats sont conformes à ceux attendus, c'est-à-dire que la quantité de cellules capturées (ou le nombre de complexes Ac/Ag créés) augmente avec le temps jusqu'à l'équilibre du milieu réactionnel et l'épuisement d'un des deux éléments.

D'un point de vue plus pratique, que ce soit pour les GR ou les PLT, l'accroche est donc notable dès 5min d'incubation. Ce point est encore une fois très intéressant car il montre qu'il est envisageable d'intégrer cette accroche en microsystème, avec une capture

progressive en débit. Pour la suite de ce travail, nous avons choisi une durée d'incubation de 15min, qui semble être un bon compromis entre rendement d'accroche et stabilité. Cette durée est courte (comparativement aux 45min initiales) et facilite grandement les expériences.

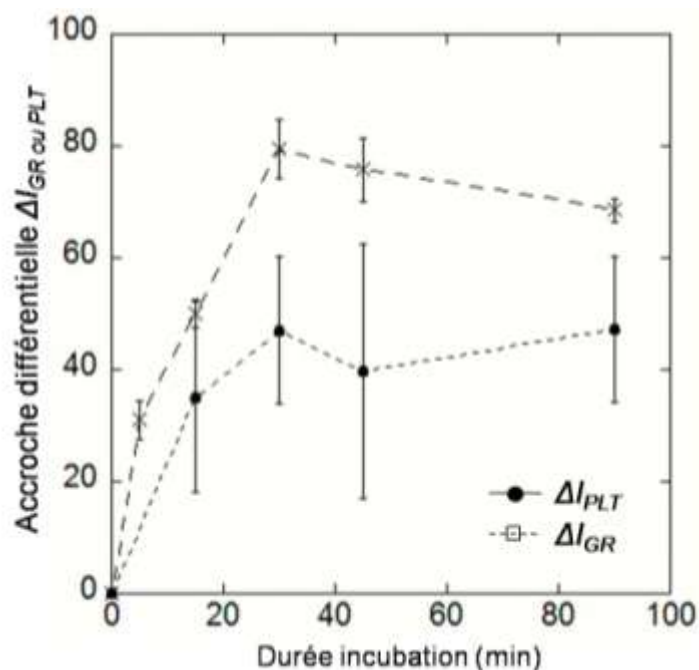


Figure X.5 : Optimisation du protocole de capture et effet du temps d'incubation sur l'accroche des cellules. L'accroche des PLT est moyennée sur 5 plots, celle des GR également.

A.5. Etude de la proportionnalité de l'accroche

L'étape suivante consiste à montrer que l'accroche obtenue est proportionnelle à la quantité réelle de cellules en solution et qu'une quantification de ces cibles est envisageable. C'est une étape essentielle en vue d'une éventuelle application de comptage. Cette étude a été menée sur les PLT et les GR et reste à réaliser pour les GB.

A.5.1. Accroche des PLT

Cette étude se fait avec le protocole optimal (15min, 25°C), à l'aide d'une gamme de dilutions obtenues à partir d'un échantillon sanguin sain ($281 \cdot 10^3$ PLT/ μ L) dilué dans du PBS 1X. Les dilutions réalisées donnent un intervalle de $1 \cdot 10^2$ à $281 \cdot 10^3$ PLT/ μ L.

L'intensité de l'accroche obtenue est représentée Figure X.6 en fonction de la concentration réelle de l'échantillon en PLT (d'après numérations de l'EFS). L'accroche évolue proportionnellement avec la concentration en PLT dans l'échantillon, avec un coefficient de régression linéaire $R^2=0,95$.

L'accroche des PLT est donc proportionnelle à la concentration en cibles dans l'échantillon, du moins dans la gamme considérée et pour un même donneur sain. Il faut noter cependant que ce cas est quelque peu biaisé. En effet, tous les composants de

l'échantillon (c'est-à-dire les PLT mais aussi les autres types cellulaires, les protéines...) sont également dilués avec la dilution des PLT. Il serait donc intéressant par la suite d'étudier une gamme de dilutions plaquettaires réelles et de se concentrer sur la gamme des concentrations humaines possibles, qu'elles soient saines ou pathologiques, afin d'éviter ce biais.

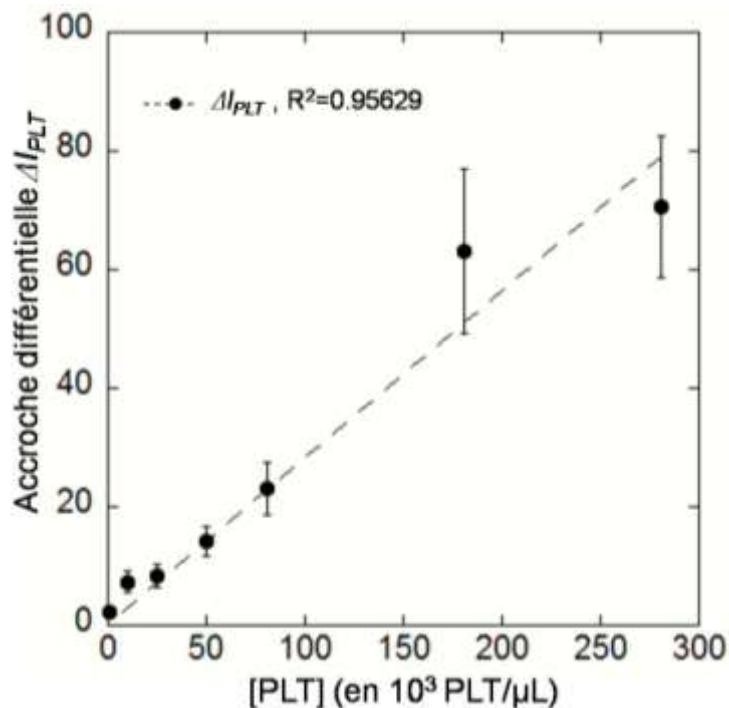


Figure X.6 : Etude de la proportionnalité de l'accroche avec la concentration cellulaire, à partir du sang dilué d'un même donneur. Accroche des PLT, moyennée sur 5 plots.

A.5.2. Accroche des GR

Cette étude se fait avec le protocole optimal (15min, 25°C), à l'aide d'une gamme de dilutions obtenues à partir d'un échantillon sanguin sain ($6,66 \cdot 10^6$ GR/μL) dilué dans du PBS 1X. Les dilutions réalisées donnent un intervalle de $5 \cdot 10^3$ à $6,66 \cdot 10^6$ GR/μL. L'intensité de l'accroche obtenue est représentée Figure X.7.a en fonction de la concentration réelle de l'échantillon en GR (d'après numérations de l'EFS).

De 0 à $5 \cdot 10^4$ /μL, l'accroche augmente avec la concentration plaquettaire, puis elle sature et reste à peu près constante de 5 à $660 \cdot 10^4$ /μL. Il semble alors qu'il n'y ait plus assez d'Ac disponibles par rapport à la concentration en PLT dans l'échantillon. Cette idée est confirmée visuellement par les plots dont la surface est densément recouverte de GR, comme représenté dans les Figure X.7.b et c. D'après une régression linéaire effectuée sur les trois premiers points et présentée dans l'insert de la Figure X.7.a, il semblerait que l'accroche soit proportionnelle pour des concentrations en PLT plus faibles ($R^2=0,98$). Mais il faudrait faire davantage d'expériences, avec des concentrations de 0 à $5 \cdot 10^4$ PLT/μL, afin de confirmer cette linéarité.

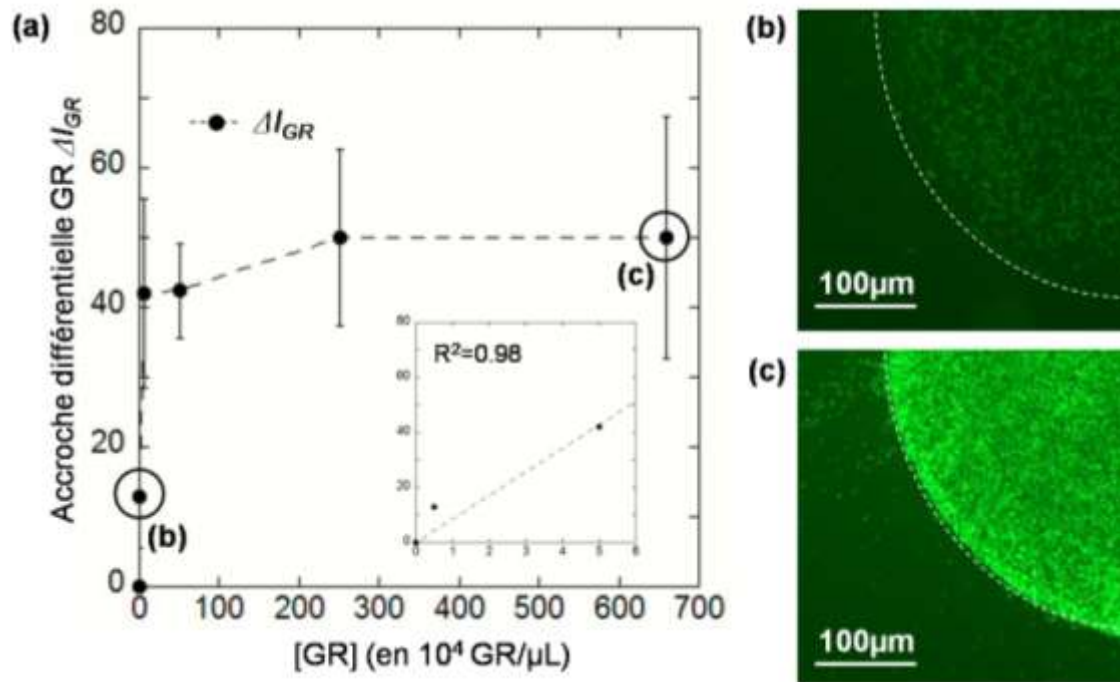


Figure X.7 : Etude de la proportionnalité de l'accroche avec la concentration cellulaire. (a) Accroche des GR, moyennée sur 5 plots. L'insert montre un zoom sur les 3 premiers points ainsi qu'une régression linéaire telle que $R^2=0,98$. (b, c) Photographies obtenues avec des conditions identiques (entre autre un temps d'exposition de 500ms) montrant des plots obtenus à partir des échantillons $0,5 \cdot 10^3/\mu\text{L}$ et $660 \cdot 10^4/\mu\text{L}$.

A.6. Conclusion

Ainsi la faisabilité d'une accroche en régime statique a été mise en évidence pour les trois types cellulaires considérés, à partir de sang total pour les GR et les PLT, à partir de buffy coat pour les GB. La fonctionnalisation permettant une accroche optimale est le protocole chimique EPF couplé aux anticorps purifiés de BD (CD235a, CD61 et CD45) déposés à $0,5 \text{ mg/mL}$. Cette accroche est spécifique pour les trois types cellulaires considérés et semble proportionnelle du moins pour les PLT. Par ailleurs, les paramètres température et temps d'incubation ont été étudiés afin de définir un protocole optimal en vue d'une intégration en microsysteme : à température ambiante, pendant 15min.

Par la suite, d'autres optimisations de ce protocole sont envisageables. Par exemple, le choix de l'anticoagulant peut également avoir une influence sur l'intensité de l'accroche, qu'il serait intéressant de quantifier. Il serait également intéressant d'essayer d'autres techniques de brassage des échantillons sur la lame, afin d'avoir une incubation plus fiable, plus reproductible, et surtout plus proche du protocole intégrable en microsysteme.

B. Applications & Perspectives

Ce paragraphe propose quelques expériences en vue d'applications futures à la capture spécifique et statique présentée précédemment. Les applications sont diverses, fonctions du type cellulaire considéré (décontamination, comptage, application génomique), mais convergent toutes vers une perspective d'intégration en microsystème.

B.1. Une application validée pour les PLT : le comptage

Une des applications ciblées est le comptage des PLT à partir d'échantillons de donneurs sains ou malades. Pour cela, il est nécessaire de vérifier que l'accroche est proportionnelle à la concentration en cibles, que le patient soit sain ou malade, c'est-à-dire quelque soit la concentration initiale des PLT dans l'échantillon.

Dans ce but, des expériences ont été réalisées aux Hôpitaux Civils de Lyon (dans le laboratoire d'Hématologie du Professeur Négrier), sur cinq échantillons sanguins différents, sains et pathologiques, avec une concentration plaquettaire allant de $54 \cdot 10^3$ à $334 \cdot 10^3$ PLT/ μ L. Ces échantillons sont utilisés directement, sans traitement particulier et sans dilution.

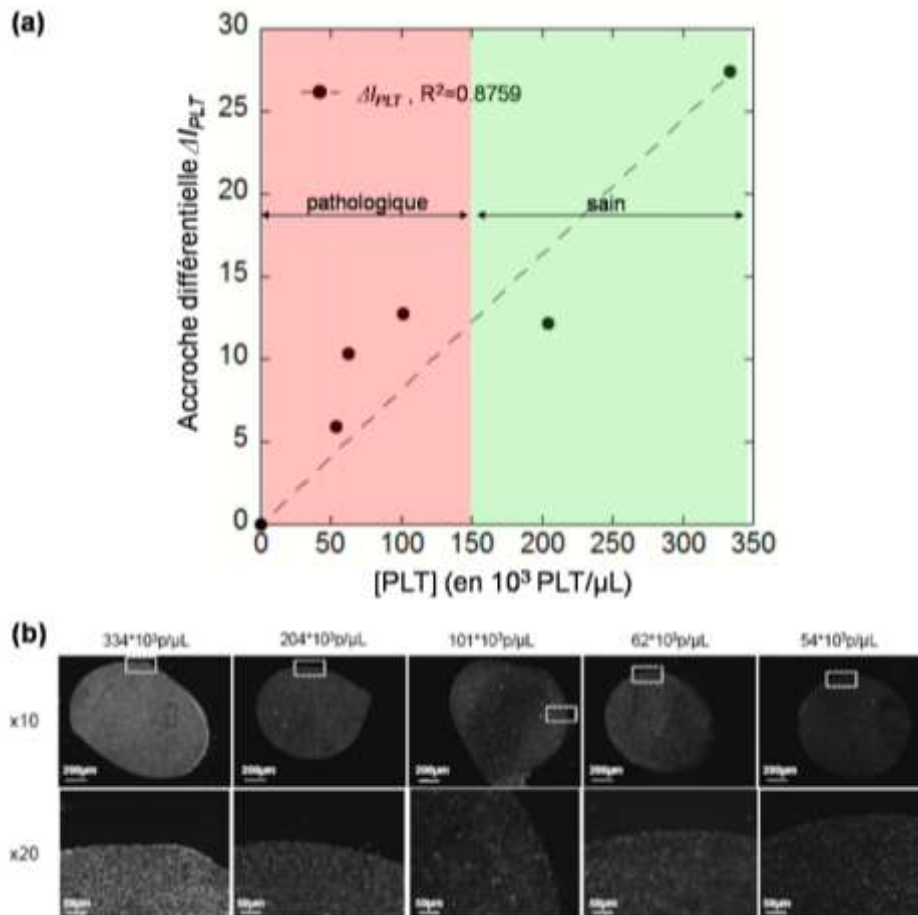


Figure X.8 : Application numération plaquettaire. (a) Accroche obtenue en fonction de la concentration plaquettaire de l'échantillon, pour des donneurs pathologiques et sains. (b) Photographies de l'accroche obtenue pour les différentes concentrations plaquettaires considérées, aux grossissements 10X et 20X.

La Figure X.8 représente l'accroche obtenue sur les cinq échantillons de sang total, avec des concentrations allant de 54.10^3 à 334.10^3 PLT/ μ L. Le graphique de la Figure X.8.a représente l'évolution de cette accroche en fonction de la concentration en PLT tandis que les photographies de la Figure X.8.b illustrent la capture obtenue. La densité de PLT accrochées augmente linéairement avec la concentration en cibles de l'échantillon, avec $R^2=0,87$. Ces résultats confirment que le nombre de PLT capturées sur le plot est proportionnel à la concentration de PLT en solution et qu'il est ainsi envisageable d'utiliser cette technique pour la numération d'échantillons sanguins, sains ou pathologiques.

B.2. Application GR et perspectives : l'accroche de cellules résiduelles

L'extraction des GR n'a pas d'intérêt direct en soi, puisque les GR font peu l'objet d'analyses biologiques. Elle a surtout été utilisée comme accroche modèle (beaucoup de GR dans un échantillon de sang et accroche facilement visualisable à l'œil nu), afin de définir un premier protocole expérimental et de mettre en évidence rapidement la faisabilité d'une accroche spécifique.

La première application à laquelle on pense est le tri cellulaire GR/GB. Il est cependant difficilement envisageable d'utiliser la capture par affinité pour ce tri. En effet, la proportion de GR est tellement importante qu'il faudrait une surface active gigantesque (et donc non compatible avec un microsystème) pour tous les accrocher. Il en est de même pour la rétention d'une grande partie des GR en vue de faciliter l'extraction ultérieure de cellules rares. A titre d'exemple : Soit $150\mu\text{m}^2$ la surface moyenne d'un GR et $75\mu\text{m}^2$ sa surface accessible pour une accroche. Considérons un échantillon de $10\mu\text{L}$ de sang complet à 5.10^6 GR/ μL . Il faudrait dans ce cas une surface plane de $37,5\text{cm}^2$ pour accrocher tous les GR de cet échantillon, en supposant que plus est que la chimie de fonctionnalisation est suffisamment efficace pour accrocher 100% des GR.

La seconde application, beaucoup plus crédible et fort intéressante, de cette accroche des GR serait de débarrasser un plasma d'éventuels GR résiduels. Par exemple, dans le cas des puces microfluidiques développées pour l'extraction du plasma dans le Chapitre 7, il serait possible d'accrocher dans les canaux d'extraction latéraux les GR contaminants et ainsi d'améliorer la pureté d'extraction du plasma ou d'augmenter le taux d'extraction avec une pureté similaire. Cette idée est développée dans la Figure X.9 : considérons 2mL de sang dilué au 1:20 (à $2,5.10^5$ GR/ μL) injecté à $100\mu\text{L}/\text{min}$ dans le dispositif optimal défini précédemment. Le plasma extrait avec un rendement de 7,4% est caractérisé par une contamination inférieure à 0,1% soit $2,5.10^2$ GR/ μL . Il faudrait alors une surface plane de $0,027\text{mm}^2$ pour accrocher tous ces GR résiduels. Cela paraît tout à fait envisageable, en supposant néanmoins que l'accroche a un rendement de 100% et que le débit dans le canal d'extraction du plasma est compatible avec cette accroche.

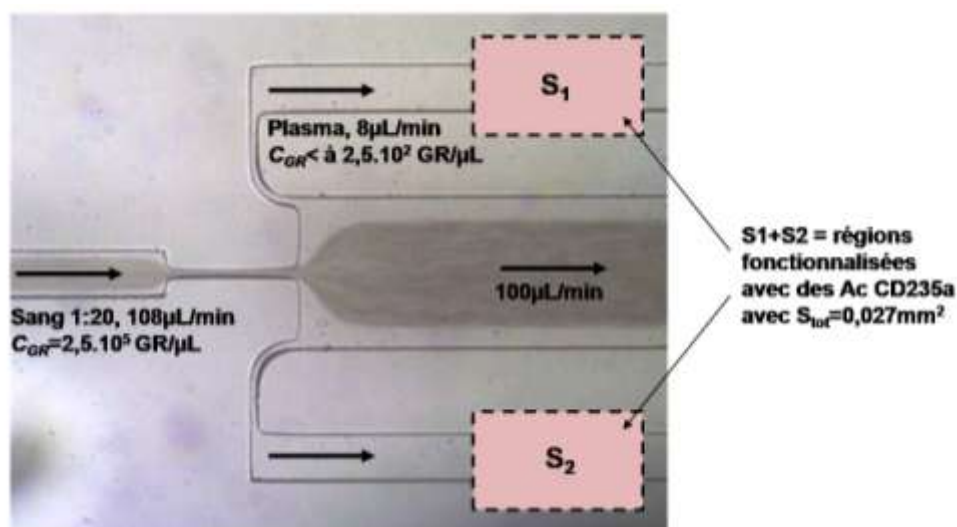


Figure X.9 : Application GR et décontamination du plasma en GR résiduels.

B.3. Application GB et perspectives : l'extraction génomique

L'application principale d'une accroche spécifique des GB est de permettre leur rétention localisée, pour ensuite lyser les GB ainsi fixés et récupérer leur ARNm. Il est en effet nécessaire de se débarrasser des GR et de leur ARN de globine qui serait un contaminant pour les analyses d'ARNm.

Cette application d'extraction génomique fait l'objet de différents travaux dans le laboratoire (dans le cadre du projet Easychip) : la voie n°1 utilise les microbilles magnétiques tandis que la voie n°2 a pour finalité la capture dans des réacteurs à piliers.

B.3.1. Méthode de référence : capture sur billes fonctionnalisées

La capture sur billes fonctionnalisées, illustrée dans le Chapitre 2, est considérée comme la méthode de référence. C'est une technique commerciale (Dynabeads) très efficace car les billes mises en suspension dans l'échantillon ont une forte probabilité de rencontre avec les cellules à capturer, grâce entre autre à l'agitation que l'on applique à la solution.

Des travaux ont été entrepris dans le laboratoire afin de maîtriser ce protocole commercial et de l'évaluer de façon quantitative, pour ensuite comparer les rendements obtenus par notre capture surfacique à ceux de cette technique de référence. Le but est également d'en comprendre les paramètres clés et de répondre à certaines questions en vue de l'intégration.

La Figure X.10 présente le protocole expérimental utilisé, sur la base du protocole conseillé par Dynal : 100 µL de sang est incubé avec 10 µL de billes durant 20min, à 4°C, avec une agitation à 300rpm par retournement total. Les différents travaux réalisés par A.G. Brachet et S. Rolati ont montré les résultats principaux suivants :

✓ *l'effet dilution.* La dilution de l'échantillon sanguin diminue fortement le rendement d'accroche, qui passe de 55-95% pour du sang non dilué à 10-20% pour du sang dilué au 1:10. Ce point est très positif car il confirme que, dans la perspective de l'intégration de cette accroche, la prise en compte d'une étape supplémentaire de dilution de l'échantillon ne sera pas nécessaire.

✓ *l'effet température d'incubation.* Des expériences ont été menées à différentes températures d'incubation (données non montrées) et ont montré que la capture devait nécessairement se faire à 4°C. En effet, comme expliqué par le protocole Dynal [DYN 08], les billes sont phagocytées par les cellules, ce qui explique cette chute du rendement à des températures autres que 4°C. Cet effet est en revanche beaucoup plus gênant pour la capture de GB en microsysteme car il implique l'intégration d'un système de refroidissement.

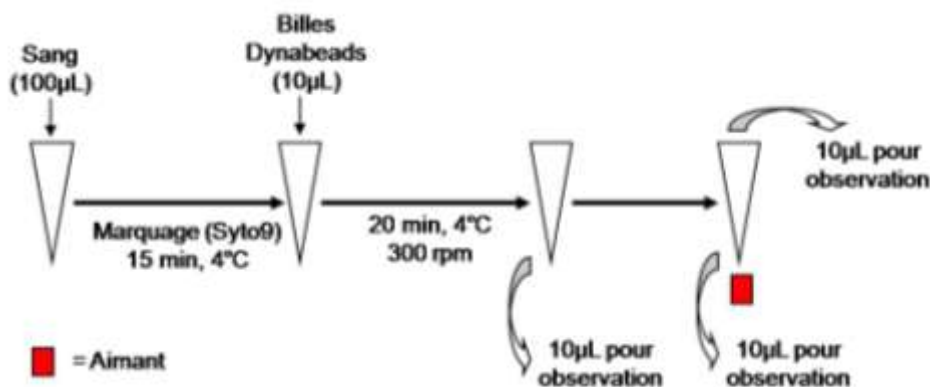


Figure X.10 : Protocole expérimental de l'accroche des GB par les billes Dynal CD45.

Donc, malgré son efficacité reconnue, cette technique comporte également des inconvénients, inhérents au protocole conseillé et qui peuvent être des points bloquants en vue d'une intégration en microsystème : la nécessité d'une fonction d'agitation, le maintien du milieu réactionnel à 4°C pour favoriser l'accroche des cellules sur les billes, l'intégration d'un aimant et l'ajout d'une étape de lavage pour récupérer les billes magnétiques et les cellules capturées.

B.3.2. Vers une capture dans un réacteur microfluidique à piliers

La capture dans un composant du type puce à piliers fonctionne en système ouvert. Le réacteur est fixe et l'échantillon avec les cellules à capturer est simplement injecté dans la puce. L'intégration de ce mode de capture dans un protocole global est grandement facilitée comparativement à la capture sur billes. Des lavages sont envisageables, les cellules étant fixées dans la puce. Cependant, cette solution a elle aussi ses limites, comme par exemple la nécessité d'utiliser des vannes ou des pompes afin de permettre la régulation et l'enchaînement des différentes étapes du protocole.

C'est pourquoi une réflexion a été récemment engagée, tirant profit de la modélisation, et du protocole d'accroche mis en évidence dans mon travail. Cette étude est le résultat d'un stage ingénieur (Arnaud Le Roy, [LER 09]), réalisé cet été au sein du laboratoire, et concernant la modélisation de la capture de grosses entités dans un microréacteur à

piliers. L'objectif principal est de trouver la géométrie et les débits d'injection et rinçage les plus adaptés au type cellulaire considéré, afin que la capture soit optimale. Dans ce but, le modèle proposé prend en compte les phénomènes suivants : la convection, l'interaction Ac/Ag, la déformation des cellules, la gêne stérique et les forces d'arrachement, schématisées dans la Figure X.11.

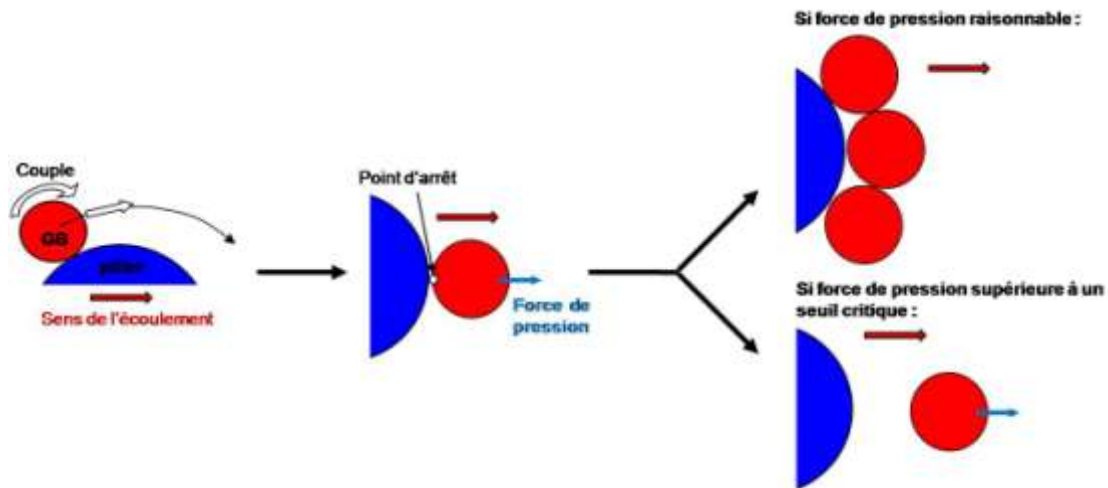


Figure X.11 : Roulement et détachement d'une cellule sur un micro pilier, d'après [LER 09]. Si les vitesses en jeu ne sont pas trop importantes, les liaisons vont résister et la cellule rester accrochée tandis que dans le cas contraire, ces liaisons vont finir par rompre. Dans ce dernier cas, soit la cellule se décroche si le flux est trop important soit la cellule roule sur le pilier.

Des expériences préliminaires ont permis de valider ce modèle sur les bactéries, et sont prévues sur les GB lorsque le processus de packaging sera stabilisé (Chapitre 9). Des nouvelles chambres à piliers, adaptées spécifiquement à l'accroche des GB, sont en cours de dimensionnement.

B.3.3. Accroche des GB en régime statique et perspectives

A court terme, des expériences supplémentaires seraient à mener pour donner suite au travail proposé dans ce chapitre :

- ✓ La première étape consisterait à déposer du sang complet à la place de la solution enrichie en GB. Afin de pallier le problème de la faible concentration des GB dans l'échantillon de sang complet, il serait très intéressant d'essayer une accroche par dépôts successifs multiples afin de mimer une accroche en flux.
- ✓ L'étape suivante serait, à échantillons similaires, de comparer le rendement de capture de l'accroche surfacique développée ici à celui de l'accroche de référence par les billes Dynabeads. De même, il serait intéressant de mener les protocoles d'extraction d'ARNm à terme dans les deux cas et de comparer leur qualité.
- ✓ Enfin, en vue d'une accroche optimale dans des chambres à piliers aux géométries les plus adaptées possibles, il faudrait estimer l'effet du temps d'incubation sur l'accroche des GB : la cinétique obtenue permettrait d'évaluer les constances d'association et de dissociation du couple GB/anti-CD45 et ainsi de préciser la modélisation mise en place par Arnaud Le Roy. Cette démarche n'a pu être menée à terme avant la fin de la rédaction de ce rapport.

B.4. Conclusion

Ainsi, un tri cellulaire par capture spécifique a été mis au point pour les PLT, les GR et les GB, fondé sur les compétences en interne de silanisation. Un protocole expérimental a été développé dans le Chapitre 9 pour une capture en régime statique puis une première optimisation de ce protocole a été proposée dans ce Chapitre 10 : une accroche spécifique est obtenue en 15min, à température ambiante.

Ces premiers résultats ont été présentés dans un poster lors de la conférence Nanobio 2009 [SOL 09.5].

Quelques perspectives ont ensuite été brièvement proposées en vue d'applications futures à cette accroche, comme le comptage plaquettaire, l'isolation des GB pour l'extraction génomique ou encore la décontamination d'un plasma en GR résiduels. Ces applications seront certainement développées davantage dans le laboratoire. Mais la prochaine étape, qui apparaît comme une suite logique à ce travail préliminaire, concernera l'intégration de cette accroche dans une chambre microfluidique. Cette étape s'avère particulièrement délicate, comme nous le verrons dans le Chapitre 11.

Partie 5 : Vers la réalisation d'un système intégré

***E**n considérant les différentes fonctions de séparation proposées, optimisées ou simplement discutées tout au long de ce travail, le Chapitre 11 introduit une réflexion quant à l'intégration système de différents protocoles biologiques, simples ou complexes. En particulier, on y aborde le problème de l'intégration de la technique d'extraction microfluidique du plasma mise au point dans le Chapitre 8 et de celle du tri cellulaire par affinité développé dans le Chapitre 10. Enfin le Chapitre 12 propose la conception et la validation d'un nouveau mode de packaging adapté à nos dispositifs.*

XI. Intégration système

L'objectif initial de cette thèse était de développer un prototype permettant le fractionnement de tous les éléments sanguins, à partir d'un échantillon le moins dilué possible. Il est apparu qu'un seul principe physique était difficilement applicable à toutes les séparations (plasma, GB, GR et PLT), qui plus est sur du sang peu dilué, et que le couplage de plusieurs étapes était nécessaire. Dans ce but, au cours de ce travail de thèse, un dispositif d'extraction microfluidique du plasma a été développé d'une part et quelques pistes ont été abordées d'autre part pour le tri cellulaire par microfluidique et capture spécifique. L'objectif de ce chapitre est de proposer une réflexion globale sur l'intégration, c'est-à-dire le couplage des différents principes de séparation disponibles, validés ou non, ainsi que sur les différents protocoles envisageables, à court et moyen terme.

Cette réflexion systémique est abordée dans une première section, à l'aide de la présentation des différents outils disponibles et protocoles envisageables. Les deux sections suivantes se penchent sur le côté pratique de l'intégration des deux solutions plus particulièrement développées ; l'extraction du plasma et la capture par affinité.

A. Approche systémique en vue d'un composant global

A.1. Les principes de séparation à disposition

On dispose de différents outils de séparation, récapitulés dans le Tableau XI-1, validés expérimentalement ou non, avec chacun leurs limites et leurs conditions d'application. Deux solutions ont principalement été développées et validées au cours de ce travail : tout d'abord le couplage de la migration latérale et de l'écoulement dans des singularités géométriques pour l'extraction du plasma puis la capture spécifique pour le tri cellulaire :

✓ Le **couplage migration latérale et singularités géométriques** a permis de développer des dispositifs originaux. Un rendement d'extraction maximal de 18% est obtenu à partir de sang dilué au 1:20 et injecté à 100 μ L/min. En outre nous avons montré que ce principe peut être exploité sur une large gamme de débits, de 50 à 200 μ L/min, et pour différentes dilutions de l'échantillon initial, de 1:50 à 1:5. Enfin, le plasma extrait a été biologiquement validé. L'extension de cette technique au tri cellulaire reste une inconnue mais semble envisageable à long terme.

✓ La **capture par affinité** a permis de développer une méthode de tri cellulaire. Cette technique s'applique au tri cellulaire. Une accroche spécifique et proportionnelle a été mise au point et optimisée, à partir de sang total non dilué pour chaque type cellulaire (à partir d'une solution enrichie pour les GB pour l'instant). Cette accroche a été validée

en régime semi-statique (sous agitation orbitale) sur une lame fonctionnalisée mais les débits d'accroche en flux seraient probablement de l'ordre du $\mu\text{L}/\text{min}$.

D'autres principes ont été abordés, testés et partiellement validés, ou sont issus de l'état de l'art. Des nouvelles puces ont été fabriquées et devraient pouvoir permettre de tester certains de ces principes :

✓ Le **couplage entre la migration latérale et l'établissement des vortex de Dean** dans un demi-canal coudé n'a pu être validé sur des échantillons sanguins. Mais les expériences réalisées dans le Chapitre 6 sur des suspensions de billes aux tailles différentes ont donné des résultats encourageants bien que non reproductibles. Les débits utilisés seraient compris entre 100 et 300 $\mu\text{L}/\text{min}$, avec une dilution importante qu'il est difficile d'estimer ici.

✓ Comme observé dans le Chapitre 5, la **filtration** peut être un principe de séparation tout à fait efficace, à la condition que l'échantillon à filtrer soit très dilué, que le débit soit inférieur à 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ et que le procédé de fabrication utilisé permette une résolution suffisante dans les dimensions des motifs filtrants. On peut envisager une filtration transverse mais également une filtration directe totale si l'objectif est de débarrasser l'échantillon de cellules résiduelles.

✓ La **lyse sélective des GB** par choc osmotique est un principe particulièrement intéressant pour une intégration en microfluidique. En effet, la cinétique de réaction est rapide (environ 10sec) et le mélange sang/tampon de lyse peut être adapté à différents débits, du moment que le temps de réaction est parfaitement contrôlé. Par exemple, si les débits imposés par les étapes fonctionnelles en amont et en aval sont de l'ordre du $\mu\text{L}/\text{min}$, le mélange peut se faire dans un motif T par simple diffusion, comme proposé dans [SET 04]. Si les débits sont plus élevés (supérieurs à 100 $\mu\text{L}/\text{min}$), on peut envisager un mélange par les vortex de Dean [SUD 06.1, SUD 06.2].

A cet effet, des expériences qualitatives de lyse partielle ont été menées dans une puce *Spirale* où, contrairement aux cas précédemment définis dans les Chapitres 5 et 7, les écoulements secondaires de Dean sont utilisés en vue d'accentuer le mélange. Quelques résultats qualitatifs sont présentés dans la Figure XI.1. La spirale contient deux entrées fluidiques, la première pour notre échantillon de sang total non dilué, la seconde pour le tampon de lyse Roche (Figure XI.1.1). A 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ par exemple, le mélange des deux phases se fait par diffusion et, malgré la longueur du canal, le mélange n'est pas complet à la fin de la spirale. A 200 $\mu\text{L}/\text{min}$, des vortex de Dean sont visibles et les deux phases semblent mélangées en fin de spirale : une grande partie des GR sont lysés et on peut distinguer des GB. La solution extraite est aussitôt injectée dans une puce *Serpentin* de profondeur filtrante 9,5 μm où on visualise GB et fantômes de GR (Figure XI.1.2). Cette expérience préliminaire montre que de nombreuses études sont envisageables sur le mélange et la filtration, en faisant varier par exemple le ratio des débits sang et tampon.

✓ La **filtration optimisée par un couplage avec les effets centrifuge/Dean**. Cette piste n'est pour l'instant qu'une idée. Des puces en silicium schématisées dans la Figure XI.2 ont été fabriquées sur le lot BLOD, avec des parties filtrantes placées dans le coude ou le long du canal rectiligne. Des expériences permettraient d'en évaluer la faisabilité et l'intérêt.

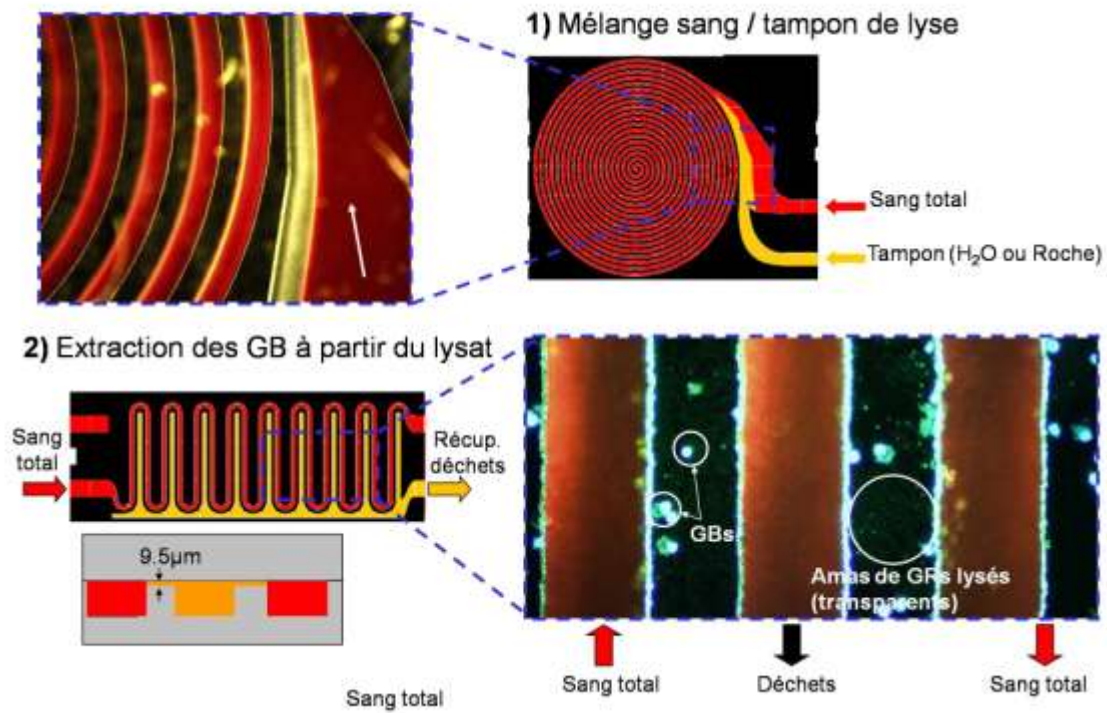


Figure XI.1 : Expériences préliminaires de lyse sélective des GR par microfluidique passive et filtration des GB à partir du lysat.

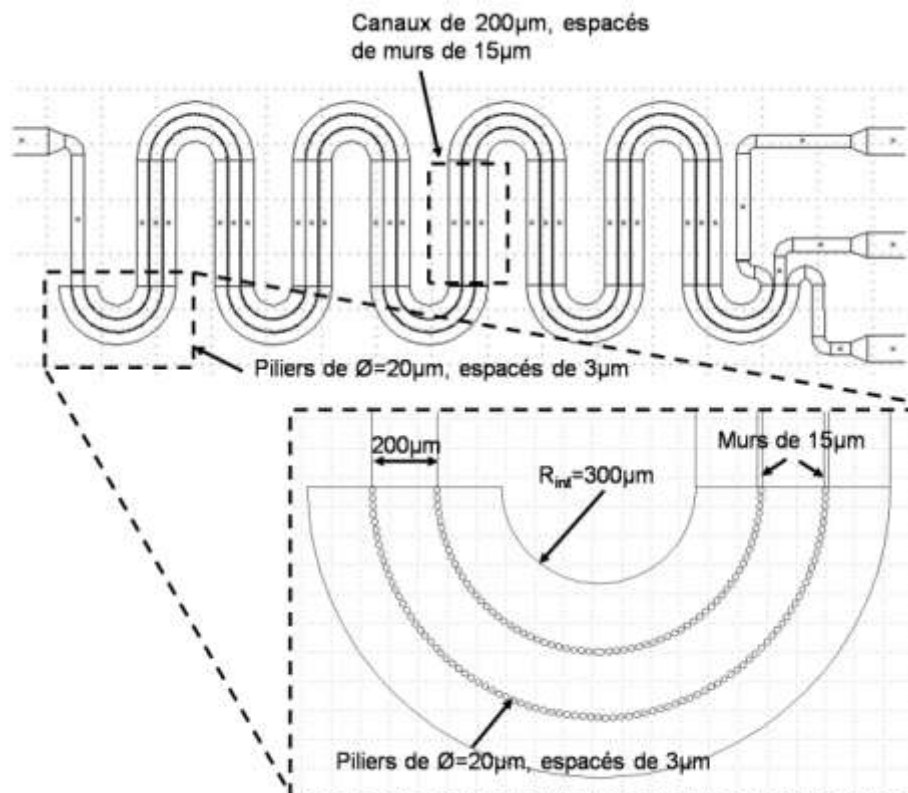


Figure XI.2 : Dispositif en vue du couplage Filtration / Ecoulements de Dean.

✓ Le **déplacement latéral déterministe** est également une solution efficace à envisager pour un tri cellulaire, comme le montre le nombre de publications récentes sur le sujet. Néanmoins il faut garder en mémoire que les débits sont généralement faibles (par exemple 18nL/min dans [DAV 06]) et une dilution importante est nécessaire.

Le Tableau XI-1 résume les différents points abordés plus en détails. Le premier tableau présente les techniques développées et validées au cours de ce travail de thèse tandis que le second tableau présente des pistes proposées.

Principes	Extraction plasma	Tri cellulaire	Débits	Dilution
Migration latérale ET Singularités géométriques	✓	?	50 à 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ (100 $\mu\text{L}/\text{min}$)	1:50 à 1:5 (1:10)
Capture par affinité	✗	✓	< 10 $\mu\text{L}/\text{min}$	NON
Migration latérale ET vortex de Dean	✓	?	100 à 300 $\mu\text{L}/\text{min}$	OUI
Filtration	✓	✓	< 10 $\mu\text{L}/\text{min}$	OUI
Filtration ET vortex de Dean	✓	?	> 100 $\mu\text{L}/\text{min}$	OUI
Réseaux de piliers DLD	✗	✓	< 1 $\mu\text{L}/\text{min}$	OUI

Tableau XI-1 : Récapitulatif des différents principes de séparation à disposition et de leurs caractéristiques.

A.2. Les problématiques à considérer

Différents outils de séparation sont donc disponibles, qu'il est nécessaire de coupler afin de permettre une séparation totale des différents éléments sanguins dans un même composant. Ce couplage est délicat, chaque technique ayant des contraintes spécifiques. Les principaux points critiques à considérer en vue d'une intégration sont les suivants :

✓ le **débit**. Par exemple, la séparation par Dean ou par recirculations nécessite un débit important (100 $\mu\text{L}/\text{min}$) tandis que la déviation des cellules par un réseau de plots nécessite un débit plus lent ($\ll 1\mu\text{L}/\text{min}$). L'incompatibilité des débits est donc un point essentiel dans le scénario considéré.

✓ le **temps**. En conséquence du point que nous venons de voir, la durée de l'étape a un effet sur la technologie utilisée. Par exemple, une fois le mélange sang / tampon de lyse effectué, il peut être nécessaire de laisser incuber l'échantillon dans une chambre d'attente pour que la réaction ait lieu. De façon plus globale, la durée du protocole de préparation de l'échantillon est également à prendre en compte et dépend de l'application diagnostic ciblée. Par exemple, un principe de fractionnement lent va à l'encontre d'une application telle que la détection du choc septique.

✓ le **volume**. Les volumes à traiter doivent être compatibles entre les différents principes choisis.

✓ la **dilution**. Elle nécessite le mélange d'un tampon avec l'échantillon. Si cette dilution se fait en dehors du système, une intervention manuelle de l'utilisateur est nécessaire en plus de l'introduction de l'échantillon. Si la dilution se fait dans le système, l'ajout d'un liquide supplémentaire à l'échantillon est à considérer (donc également son déplacement, avec un pousse-seringues par exemple) de même que l'intégration d'un mélangeur dans le dispositif.

✓ l'**ordre séquentiel des étapes et principes associés**, c'est-à-dire la notion de protocole. Cet ordre définit les technologies microfluidiques nécessaires, comme par exemple l'utilisation de vannes dans le cas d'un rinçage d'une étape à l'autre, de chambres d'attente, d'un mélangeur ou même de réactifs embarqués. Cette notion de protocole est difficile à mettre en œuvre dans un dispositif de microfluidique passive.

C'est pourquoi on distinguera par la suite deux approches distinctes. Tout d'abord il y a l'intégration d'un protocole simple, à court terme, dans un composant quasi passif où seul l'écoulement du fluide est à contrôler. Puis il y a l'intégration d'un protocole plus complexe, à plus long terme, qui va nécessiter des éléments technologiques autres que le seul contrôle de l'écoulement (vannes et pompes...).

Admettons que les différentes pistes proposées sont réalistes et voyons comment elles peuvent être intégrées dans une chaîne globale d'analyse sanguine.

A.3. Intégration d'un protocole simple

Les dispositifs proposés dans le Chapitre 7 pour l'extraction microfluidique et continue du plasma ont été optimisés et biologiquement validés, fondés sur l'augmentation de la couche claire dans les singularités géométriques. C'est pourquoi une première intégration en microsystème est envisageable à court terme, comme illustrée dans la Figure XI.3.a. Au regard de l'état de l'art, où seule la récente publication de Fan et col. [FAN 08] intègre l'extraction du plasma et l'analyse dans un même dispositif fluidique schématisé Figure XI.3.b, ce microsystème semble original.

Le composant proposé comprend une entrée pour le sang, dilué au préalable, et deux sorties. L'étape d'extraction du plasma permet de récupérer le plasma en flux dans un microcanal et de l'envoyer dans l'étape analytique intégrée dans le dispositif, l'objectif étant de détecter ou de doser un analyte du plasma. L'analyte choisi pour la mise en place d'un démonstrateur biologique restera à déterminer, en collaboration avec des biologistes et des technologues.

Cependant, on envisage principalement l'utilisation d'une puce à protéines [CHE 06], où des sondes spécifiques seraient greffées dans nos canaux afin d'attraper par exemple des biomarqueurs pour la détection de l'hépatite, l'étude des facteurs de croissance... Ce choix se justifie par le débit dans notre canal d'extraction qui serait tout à fait compatible avec une accroche par affinité.

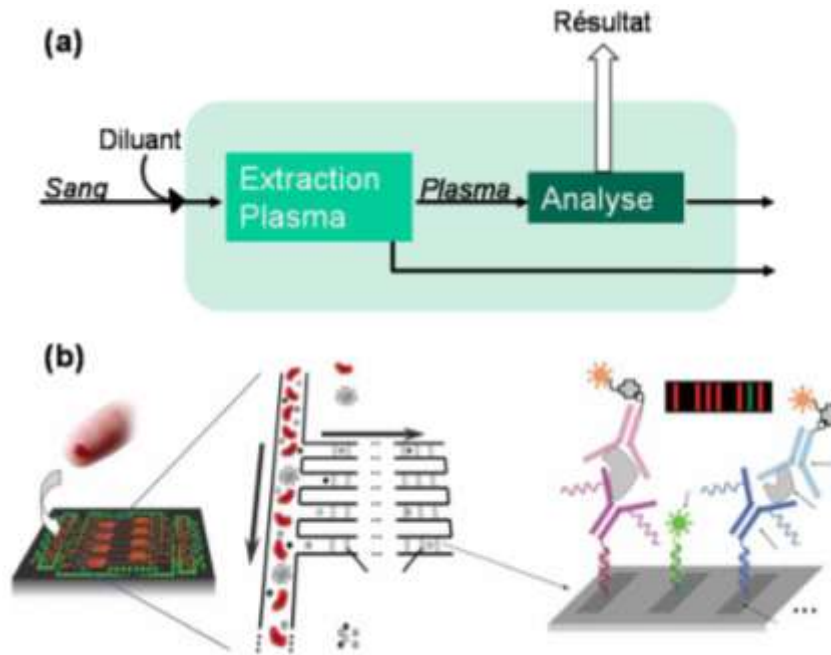


Figure XI.3 : Proposition de dispositif intégré pour l'extraction et l'analyse du plasma. (a) Schéma du dispositif. (b) Dispositif intégré récemment proposé par Fan et col. dans [FAN 08].

✓ Le débit d'injection de l'échantillon sanguin est préférentiellement de $100\mu\text{L}/\text{min}$ pour des raisons pratiques, mais comme le rendement est constant de 50 à $200\mu\text{L}/\text{min}$, nous disposons d'une certaine marge de manœuvre en fonction du débit à appliquer dans l'étape d'analyse (typiquement de 1 à $10\mu\text{L}/\text{min}$ ici).

✓ S'il est nécessaire, selon l'analyse visée, que le plasma soit ôté de toutes cellules résiduelles, il est tout à fait envisageable d'ajouter après l'extraction une étape de filtration ou de capture spécifique.

✓ L'échantillon doit être dilué, ce qui implique l'ajout d'un volume de tampon PBS, soit dans le tube de l'échantillon avant l'injection dans la puce, soit dans la puce elle-même mais dans ce dernier cas, un mélangeur est nécessaire.

✓ Suivant l'analyse choisie, il faudra adapter la technologie du biocapteur ainsi que la microfluidique correspondante. On peut imaginer l'intégration d'une puce à protéines couplée à une simple mesure de fluorescence comme dans [FAN 08], auquel cas une étape d'injection du fluorophore de détection et de son rinçage est nécessaire. On peut également penser à une détection directe des protéines sur nanofils [ZHE 05].

En vue de cette intégration, certains points essentiels restent à être optimisés :

✗ L'utilisation de deux pousse-seringues pour le contrôle du ratio d'extraction doit être simplifiée et remplacée par un contrôle par pertes de charges. Ce point est abordé dans une section suivante, de même que le contrôle en pression.

✗ Le rendement d'extraction volumique, actuellement de 20% pour du sang dilué au $1:20$, est suffisant pour certaines applications mais pas assez pour d'autres. Pour cela, la principale piste envisagée est la mise en série de plusieurs dispositifs. Cette perspective est abordée dans un des paragraphes suivants.

✱ On peut envisager un microsystème avec une technologie hybride, par exemple un dispositif d'extraction en PDMS ou une carte moulée en PC, avec une puce d'analyse amovible en silicium, ayant des canaux fonctionnalisés pour une accroche de protéines cibles, cette fonctionnalisation variant selon le diagnostic à réaliser.

✱ Si l'analyse ciblée nécessite le mélange avec un réactif, on peut imaginer le couplage de notre extraction continue du plasma avec un dispositif analytique du type électromouillage : des gouttes de plasma seraient extraites, mélangées sur une puce Ewod [FOU 08] puis soumises à un dosage par test enzymatique colorimétrique, comme par exemple le dosage glycémique proposé par Srinivasan et col. [SRI 04].

A.4. Intégration d'un protocole plus complexe

Le système optimum serait l'intégration d'un protocole complexe pour le tri total des différents constituants du sang : plasma, GR, GB et éventuellement PLT.

Afin de réaliser ce tri, trois scénarios semblent globalement envisageables ; ils sont récapitulés dans la Figure XI.4. Dans chacun des trois scénarios, on a séparé les étapes d'extraction du plasma et du tri cellulaire (en particulier de l'extraction des GB). Les scénarios 1 et 2 commencent tous deux par l'extraction du plasma suivie de l'extraction des GB, facilitée (scénario 2) ou non (scénario 1) par une étape préliminaire de lyse sélective des GR. Le scénario 3, quant à lui, propose l'extraction des GB avant celle du plasma. Dans la suite de cette section, un synoptique est présenté pour chaque scénario, accompagné d'une analyse des difficultés rencontrées et des points forts au vu du cahier des charges initial.

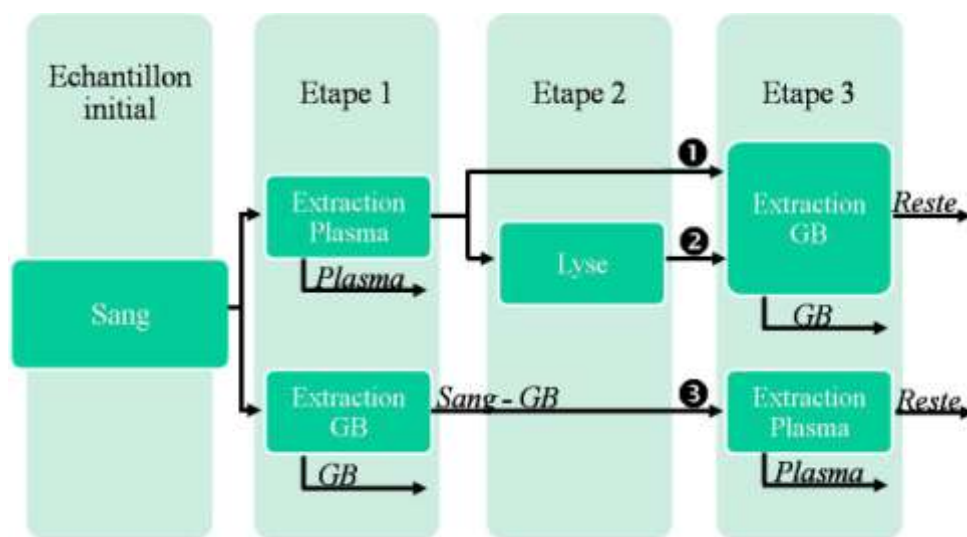


Figure XI.4 : Représentation schématique des différents protocoles envisagés pour l'intégration du fractionnement sanguin dans un même dispositif. Chaque scénario est détaillé par la suite.

A notre connaissance, il n'existe pas de microsystème permettant ce fractionnement global des composants du sang. Les quelques protocoles complets intégrés concernent l'extraction des GB par filtration à partir d'échantillons sanguins très fortement dilués ($> 1:100$), puis leur lyse et l'extraction de l'ADN qu'ils contiennent [PAN 05, CHE 07.2].

A.4.1. Scénarios n° ❶ et ❷ : extraction plasma puis extraction GB

Les scénarios 1 et 2 sont tous les deux schématisés dans la Figure XI.5 ci-dessous. Les deux organigrammes présentés diffèrent par le tri cellulaire qui est réalisé par microfluidique passive dans la Figure XI.5.a et par capture spécifique dans la Figure XI.5.b.

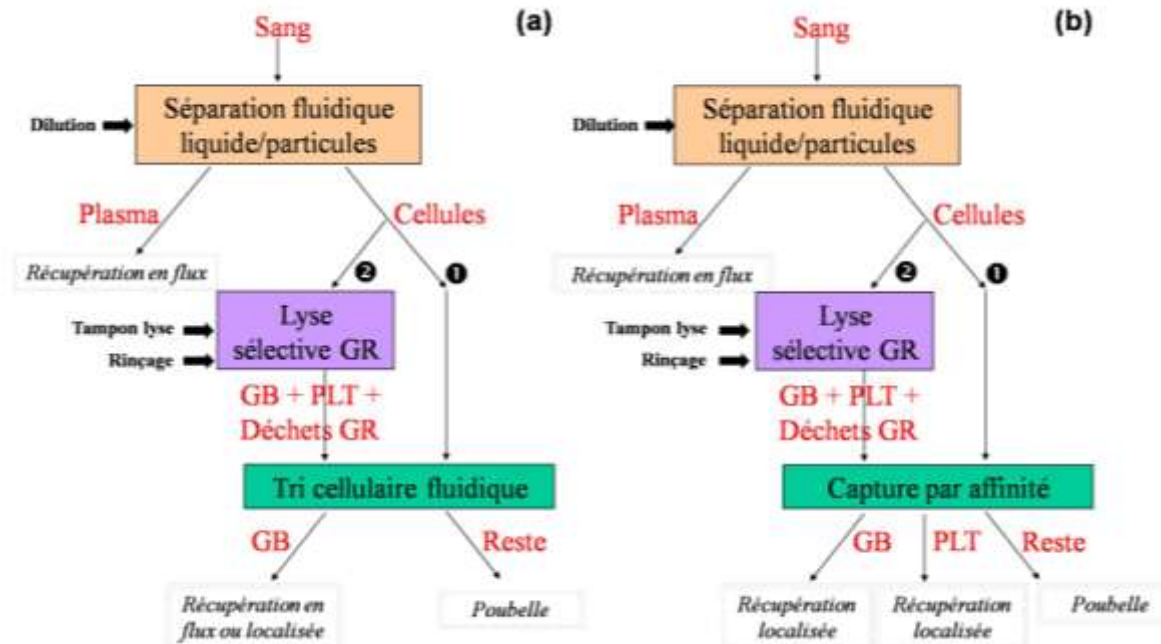


Figure XI.5 : Description schématique des scénarios 1 et 2, dans lesquels l'extraction microfluidique du plasma est suivie du tri cellulaire, par microfluidique passive ou par capture spécifique, précédé ou non d'une lyse sélective des GR.

✓ La lyse sélective impose quelques contraintes. Tout d'abord le milieu doit être rincé avec un tampon adapté afin de revenir à une bonne osmolarité. Le temps de réaction doit être parfaitement ajusté afin de ne lyser que les GR et d'activer le moins possible les GB.

✓ Le tri cellulaire fluide sans lyse paraît plus intéressant car il permet de sélectionner les cellules d'intérêt en modifiant au minimum leur milieu environnant, et sans la nécessité d'une étape de mélange. En pratique, il nous semble cependant plus difficile à réaliser (sans une mise au point importante) et nécessite une forte dilution. Tandis qu'après une lyse partielle, le tri cellulaire se réduit à une extraction des GB à partir d'une suspension constituée principalement de GB et de déchets cellulaires issus de la lyse des GR.

✓ La capture par affinité après lyse sélective n'a pas été essayée. Les GB et PLT peuvent avoir leur surface modifiée par le choc osmotique et l'efficacité de capture s'en voir altérée. Il est donc difficile d'estimer la faisabilité et l'intérêt de ce protocole (scénario 2). D'autant plus que dans le scénario 1, une accroche est possible sur sang total, même sans dilution.

✓ Dans le cas du scénario 1 de la Figure XI.5.a, il serait intéressant de tester la centrifugation dans notre dispositif *Pince à cheveux* (présenté dans le Chapitre 7) afin

de réaliser l'extraction des GB à partir du sang lysé. L'autre solution envisageable est l'utilisation d'une filtration tangentielle.

✓ Après capture par affinité, dans une chambre à piliers par exemple, une étape de lavage et décrochage est nécessaire pour récupérer les cellules ciblées en flux. Suivant le couple Ac/Ag considéré, la constante de dissociation n'étant pas la même, il est possible d'appliquer des débits différents pour récupérer tel ou tel type de cellule.

A.4.2. Scénario n° ③ : extraction GB puis extraction plasma

Le scénario 3 est schématisé dans la Figure XI.6 ci-dessous. Les deux organigrammes présentés diffèrent par le tri cellulaire qui est réalisé par microfluidique passive dans la Figure XI.6.a et par capture spécifique dans la Figure XI.6.b.

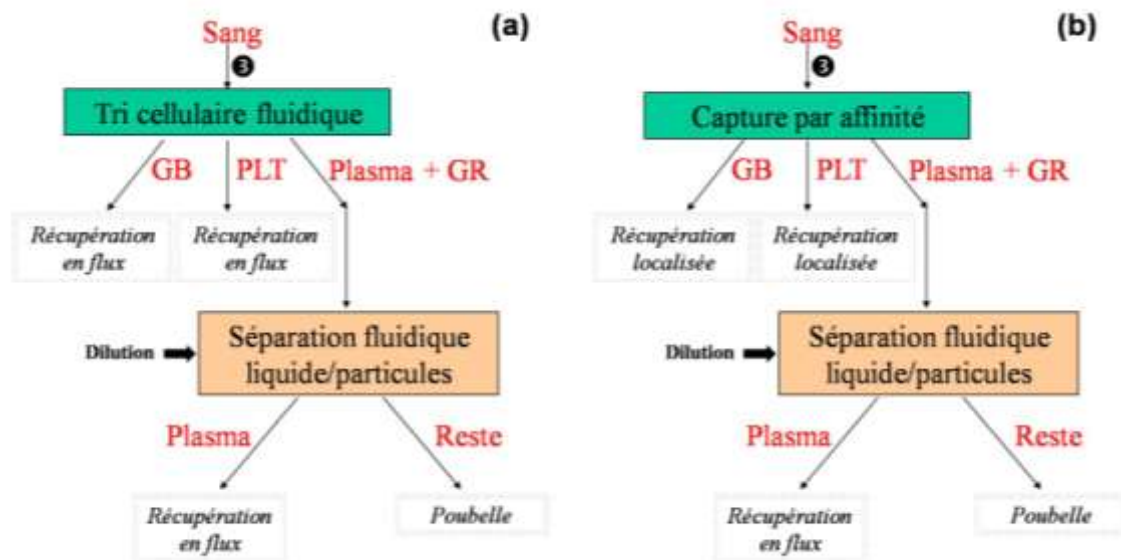


Figure XI.6 : Description schématique du scénario 3, dans lequel l'extraction microfluidique du plasma est précédée du tri cellulaire, par microfluidique passive ou par capture spécifique.

✓ Dans le cas où l'extraction des GB nécessite une lyse sélective des GR au préalable, il est nécessaire que le plasma ait déjà été récupéré. En effet la lyse des GR va relarguer toute l'hémoglobine qu'ils contiennent et nous avons vu que l'hémoglobine est une protéine contaminante aussi bien pour les analyses protéiques que les analyses génomiques. C'est pourquoi dans le scénario proposé ici, il n'est pas possible d'utiliser une lyse sélective pour faciliter le tri cellulaire avant l'extraction du plasma.

✓ Pour les raisons expliquées sur les scénarios précédents, la première étape de la Figure XI.6.a paraît difficile, car hypothétique et nécessitant une dilution probablement très importante.

✓ Il est fort possible que les débits ne soient pas compatibles entre les deux étapes de la Figure XI.6.b.

Ainsi, après description des trois scénarios possibles à ce niveau de l'étude, il semble que les protocoles les plus appropriés en vue d'une intégration globale en microsystème soient la proposition 1 de la Figure XI.5.a (c'est-à-dire extraction plasma / lyse / tri cellulaire fluide) et la proposition 2 de la Figure XI.5.b (c'est-à-dire extraction plasma / tri cellulaire par capture).

A.5. Conclusion

Ainsi, à l'issue de cette analyse, l'intégration de deux approches peut être envisageable. Une première approche, simple, paraît très réaliste à court terme et fait l'objet de quelques études proposées dans la suite de chapitre. Une réflexion menée conjointement avec des biologistes et des technologues devrait pouvoir mener au choix d'une application biologique compatible avec notre système de préparation afin de rapidement mettre en place une preuve de concept. Dans un second temps, l'intégration d'un protocole complexe paraît faisable mais demande encore du travail avant le développement d'une maquette réaliste. En particulier, l'étape complexe d'extraction microfluidique des GB doit être développée davantage.

B. Intégration de l'extraction microfluidique du plasma

L'utilisation d'un dispositif à débit imposé nécessite la mise en œuvre d'un système macroscopique, comme un pousse-seringue, dont les dimensions sont incompatibles avec l'objectif de miniaturisation. Ce type de solution trouve ses limites dans la nécessité d'interfacer le dispositif microscopique avec le système qui impose l'écoulement. L'expérimentateur se retrouve alors avec un dispositif complexe occupant un volume réduit (1cm) mais dont le système de commande occupe un volume important ; l'intégration de micropompes dans le composant n'étant pas réaliste pour ce type d'application. C'est pourquoi différentes actions sont menées pour tenter de simplifier notre système.

B.1. Contrôle de l'extraction par pertes de charge

Le but de ce travail préliminaire est de dimensionner une connectique qui permettrait de supprimer le pousse-seringue d'aspiration afin de simplifier le montage de la puce. Ce travail s'inscrit dans une démarche à plus long terme en vue d'intégrer l'extraction entre le prélèvement et l'analyse.

Des expériences préliminaires peuvent être réalisées avant de proposer des nouvelles géométries de composants. Il faut en effet vérifier tout d'abord qu'un contrôle des rendements d'extraction par pertes de charge est possible ici et compatible avec l'échantillon sanguin. Ce point est loin d'être évident pour un échantillon dont la viscosité est variable en fonction du diamètre du canal et en fonction de l'endroit où l'on se place dans la section du canal, comme expliqué dans le Chapitre 1.

B.1.1. Preuve de concept

La première étape vers la suppression du pousse-seringues s'appuie sur des puces déjà existantes, c'est-à-dire le dispositif nominal F du Chapitre 8, qui a été testé précédemment et montré son efficacité.

Le principe de ce dispositif est rappelé dans la Figure XI.7.a. Le sang entre dans le canal d'entrée (I), avec un débit Q_I imposé par le pousse-seringues d'injection, puis ressort par la sortie principale (O) avec un débit Q_O , tandis que le plasma est extrait dans les deux canaux latéraux d'extraction (O_E) avec un débit d'extraction Q_E . Le second pousse-seringues est supprimé au niveau de la sortie principale. Il a été montré dans le Chapitre 7 que ce dispositif permettait un rendement maximal d'extraction η d'environ 20%, soit un ratio de 0,8 entre les débits d'entrée et de sortie principale. On cherche à retrouver ce ratio, habituellement imposé à l'aide de deux pousse-seringues, par le contrôle des résistances fluidiques des capillaires de sortie. Cette expérience présente l'avantage d'être facile et rapide à mettre en œuvre, et de valider rapidement la possibilité d'un contrôle par pertes de charge.

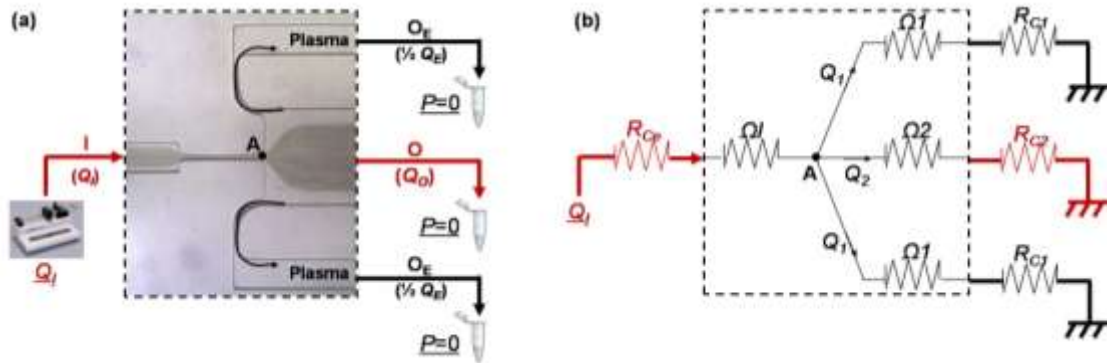


Figure XI.7 : Dispositif F pour l'extraction du plasma et schéma électrique équivalent.

✓ Analogie électrique

Pour cela, on utilise l'analogie électrique expliquée dans le Chapitre 3 dont on rappelle les points essentiels ici. L'échantillon étant injecté dans le microsystème à l'aide d'un pousse-seringues, l'écoulement est de type Poiseuille et contrôlé par des pertes de charge. Il est alors possible de faire une analogie entre les circuits microfluidiques et les circuits électriques, dans laquelle la pression est équivalente à la tension, le débit à l'intensité, la résistance fluidique à la résistance électrique, la déformation des canaux à une capacité et l'inertie à une impédance.

Les effets inertiels et la déformation des canaux sont négligés, les pertes de charge singulières ne seront pas prises en compte. L'analogie électrique est donc réduite à l'utilisation de résistances, en supposant que la viscosité du sang est homogène sur la largeur du canal. Le schéma électrique équivalent à notre dispositif fluidique est présenté dans la Figure XI.7.b.

Résistances fluidiques : A chaque zone d'écoulement fluide, que ce soit un capillaire ou un canal de la puce, correspond une résistance fluide : soient R_C la résistance des capillaires, de section circulaire, et Ω la résistance des canaux, de section rectangulaire,

$$\Omega = \frac{8\mu L(w+b)^2}{b^3 w^3} \text{ et } R_C = \frac{8\mu L}{\pi r^4}$$

où μ est la viscosité dynamique du fluide (définie à $1,5 \cdot 10^{-3}$ Pa.s), L la longueur du canal, w et b les largeur et profondeur de la section rectangulaire, r le rayon de la section circulaire.

Relations : L'équivalence électrique permet d'obtenir les relations suivantes,

$$\begin{aligned} Q_I &= 2Q_1 + Q_2 \\ P_A &= (\Omega_1 + R_{C1})Q_1 = R_1 Q_1 \\ P_A &= (\Omega_2 + R_{C2})Q_2 = R_2 Q_2 \\ Q_2 &= \alpha Q_1 \end{aligned}$$

Ces différentes relations permettent de relier les résistances fluidiques entre elles à l'aide de l'équation suivante :

$$\frac{R_1}{R_2} = \frac{2\alpha}{(1-\alpha)} \text{ avec } R_1 = \Omega_1 + R_{C1} \text{ et } R_2 = \Omega_2 + R_{C2} \text{ et } \alpha = \frac{Q_2}{Q_1}$$

Un premier calcul a montré qu'en utilisant la connectique habituelle ($R_{Ce}=R_{C2}$, $L=5$ cm et $r=50\mu\text{m}$, $\alpha=0,8$ pour $\eta=20\%$) il serait nécessaire d'avoir une résistance fluide R_{C1} de $2,4 \cdot 10^{14}$ N.s.m⁻⁵, soit une longueur de capillaire de 39,9 cm. Une telle longueur n'est pas raisonnable. La connectique classique ne convient pas ici et doit, par conséquent, être modifiée. La perte de charge étant en $1/r^4$, la solution la plus simple est de jouer sur les diamètres des capillaires.

La nouvelle connectique mise en place est la suivante : pour la sortie centrale $L=7$ cm et $r=37,5\mu\text{m}$, pour les deux sorties latérales $L=4,5$ cm et $r=20\mu\text{m}$, pour l'entrée $L=5$ cm, $r=50\mu\text{m}$ + $L=15$ cm, $r=187,5\mu\text{m}$. Du sang dilué 1:20 a été injecté dans un dispositif F connecté de cette façon et a donné un rendement d'extraction η d'environ 16%. Considérant la simplicité du modèle choisi et la valeur très approximative utilisée pour la viscosité du sang, cette valeur est tout à fait cohérente avec les 17,8% obtenus en utilisant deux pousse-seringues.

Cette connectique a prouvé que le phénomène d'extraction proposé fonctionnait normalement par pertes de charge, et que cette analogie électrique simplifiée était valide. Il est donc envisageable de dimensionner des nouveaux dispositifs sur la base de ce modèle et de considérer comme négligeable la variabilité d'un donneur à l'autre. Par la suite, on pourra affiner ces calculs en considérant la différence de viscosité entre le plasma et le sang ainsi que l'effet de la dilution.

B.1.2. Fabrication de nouveaux dispositifs

A partir de ce travail préliminaire de modélisation, des nouvelles puces ont été dessinées et sont représentées dans la Figure XI.8.

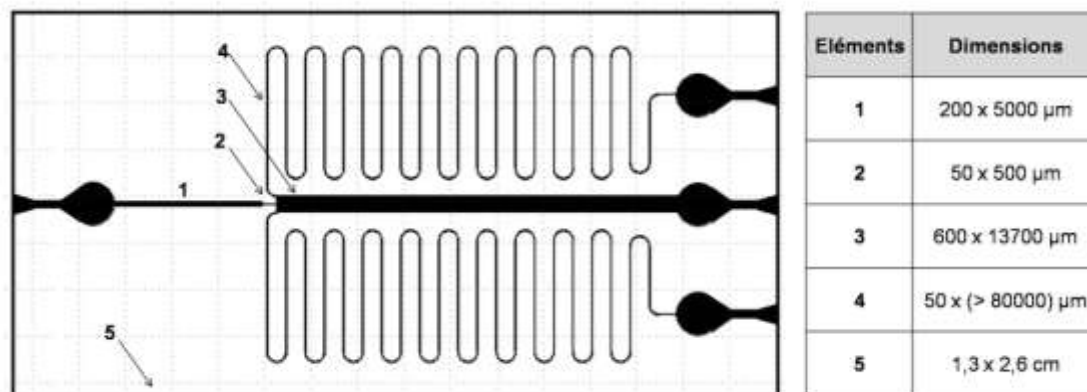


Figure XI.8 : Dispositif proposé.

Ces puces ne modifient pas la géométrie de l'extraction mais uniquement les canaux du plasma. La principale nouveauté de ces puces est l'ajout de serpentins, dont le but est d'augmenter la résistance fluide des canaux de sortie afin de contrôler le ratio des débits uniquement dans le dispositif et non dans la connectique. L'objectif est en effet de pouvoir utiliser le packaging classique (5cm de capillaire avec un diamètre intérieur de 100 μm) de manière semblable pour l'ensemble des canaux, afin de faciliter la tâche de l'expérimentateur.

Ces dispositifs sont en cours de fabrication et des expériences devraient être menées à court terme afin d'en valider le principe. Par ailleurs, l'augmentation de la surface parcourue par le plasma dans les canaux d'extraction pourrait accentuer le risque d'adsorption non spécifique de ces analytes ; ce point sera à vérifier.

B.2. Contrôle de l'extraction en pression

Des expériences d'extraction ont été menées à l'aide d'un générateur de pression (Fluigent). Comme expliqué dans le Chapitre 4, cette méthode de contrôle de l'injection présente les avantages suivants : l'établissement de l'écoulement est quasi-immédiat et les fluctuations observées et décrites dans le Chapitre 8 ne sont pas visibles ici. Cette méthode d'injection est donc la voie optimale pour la suite de l'intégration. Par ailleurs, il a été montré que le rendement d'extraction était constant sur une large gamme de débits ; ainsi, même si le contrôle en pression ne donne pas d'information directe sur le débit, cela ne devrait pas être gênant ici. Par la suite, une extraction par aspiration sous vide sera également envisageable.

B.3. Mise en série de dispositifs

Afin d'augmenter de façon importante le rendement d'extraction de notre système, la perspective principale envisagée est la mise en série ou en parallèle de plusieurs dispositifs.

B.3.1. Preuve de concept

La Figure XI.9 présente les résultats préliminaires obtenus afin d'estimer la faisabilité de cette mise en série. Les profils de répartition des GR dans la section du canal sont obtenus avec le logiciel ImageJ en différents endroits du dispositif et comparés.

Un échantillon de sang dilué au 1:20 est injecté dans le dispositif n°1 à 50µL/min. La couche appauvrie avant restriction est claire et bien délimitée (a, $\varepsilon(a)=22\mu\text{m}$). Après une augmentation due à l'effet restriction et à l'élargissement du canal, un volume de 12.3% de plasma sans cellules est extrait dans les coins de l'élargissement (b). Ce volume correspond à l'extraction maximale possible sur ce dispositif, puisque des GR commencent à contaminer les canaux d'extraction. On voit d'ailleurs qu'après cette extraction, la couche appauvrie est très faible (c, $\varepsilon(c)=16\mu\text{m}$) et plus trouble qu'en (a). Pourtant, après une distance suffisante (d, $\varepsilon(d)=22\mu\text{m}$) et une restriction (e), la couche appauvrie redevient claire à nouveau. Un nouvel élargissement rendrait possible une nouvelle extraction de plasma en (f). Ceci est confirmé par le profil et la couche appauvrie en (g, $\varepsilon(g)=23\mu\text{m}$), parfaitement définie et qui semble clairement exploitable comme en (a).

Cette expérience préliminaire valide la possibilité de la mise en série de plusieurs dispositifs à condition de permettre à l'écoulement (et à la couche claire) de se ré-établir. La suite de ce travail consisterait à mettre plusieurs de ces dispositifs en série et d'estimer le nombre d'extractions qu'il serait possible de cumuler. A cet effet, on pourra s'appuyer sur l'étude de l'effet dilution abordé au Chapitre 8.

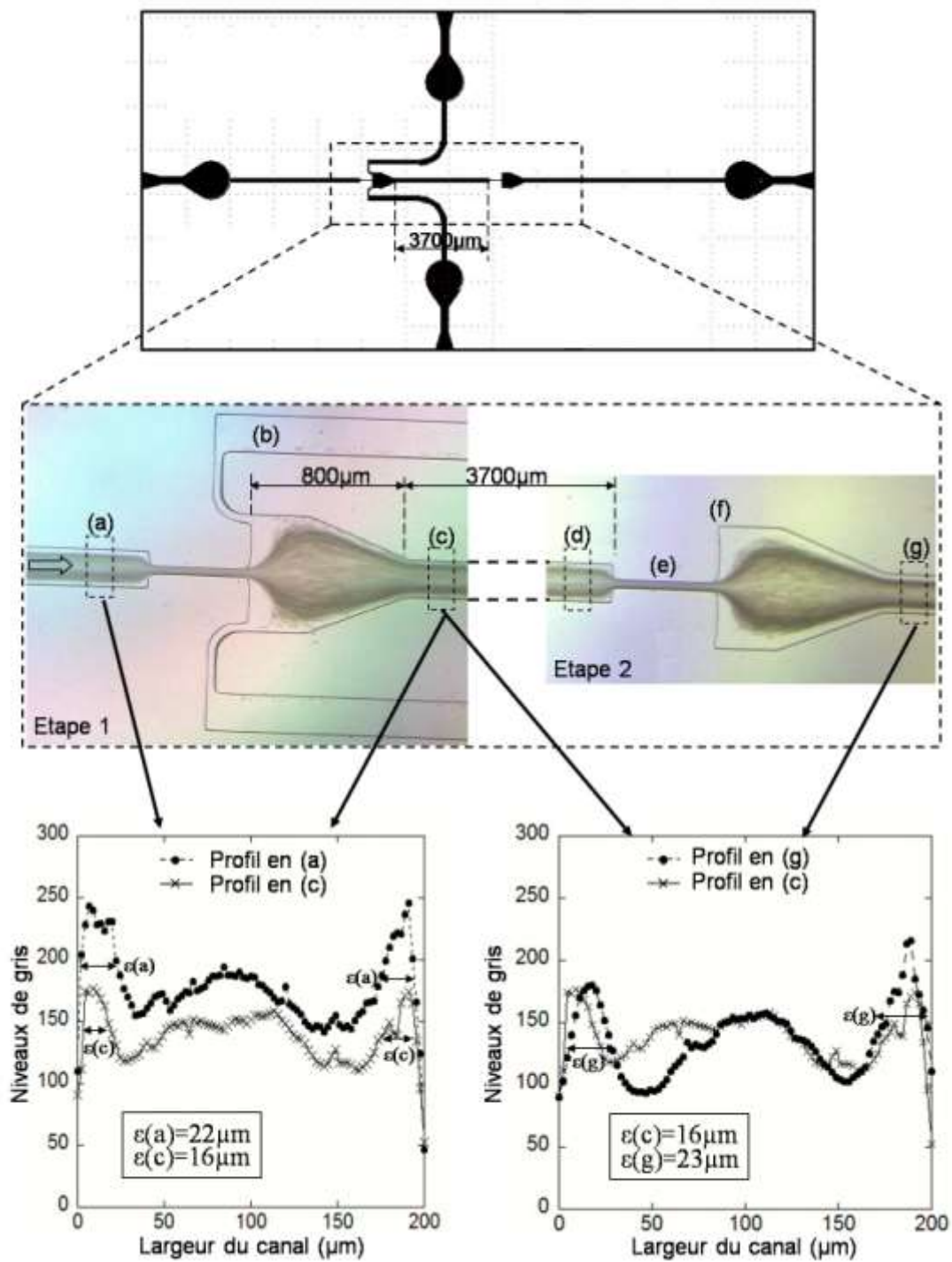


Figure XI.9: Résultats préliminaires en vue de l'extraction en série du plasma, obtenus pour du sang 1:20 injecté à 50 $\mu\text{L}/\text{min}$. $\varepsilon(a)=22\text{ }\mu\text{m}$, $\varepsilon(c)=16\text{ }\mu\text{m}$, $\varepsilon(d)=22\text{ }\mu\text{m}$, $\varepsilon(g)=23\text{ }\mu\text{m}$.

B.3.2. Fabrication de nouveaux dispositifs

A partir du travail de modélisation précédent, des nouvelles puces ont été dessinées et sont représentées dans la Figure XI.10.

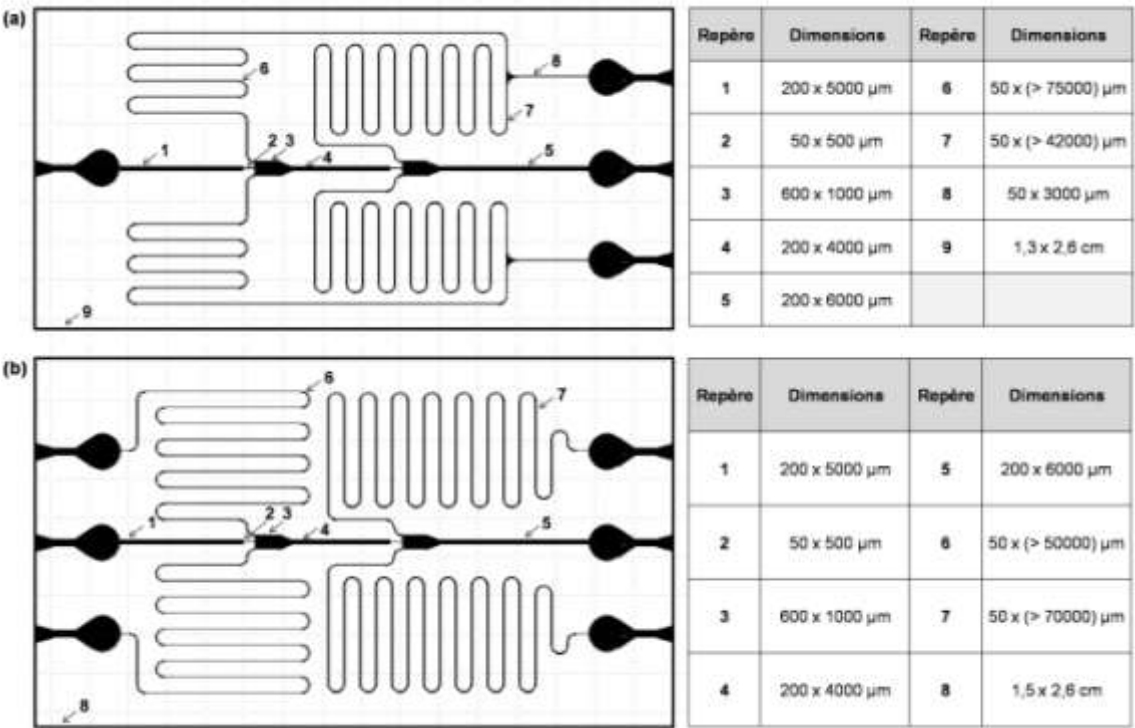


Figure XI.10 : Dispositifs proposés, avec (a) deux sorties d'extraction ou (b) quatre sorties d'extraction.

Comme précédemment dans la Figure XI.8, ces nouvelles géométries se caractérisent par l'ajout de canaux en serpentin afin de permettre une extraction par pertes de charge au niveau du dispositif et non de la connectique. Les puces sont en cours de fabrication et seraient à tester.

B.4. Conclusion

Ainsi la faisabilité d'une simplification du dispositif d'extraction microfluidique du plasma a été mise en évidence dans cette section. Un des deux pousse-seringues a été supprimé et le contrôle en pression de l'injection a été validé. Une fois les débits stabilisés et adaptés à l'application biologique ciblée, l'intégration du protocole simple « extraction plasma et analyse » défini précédemment devrait être possible à court terme. Par ailleurs, les expériences préliminaires laissent envisager qu'une mise en série de plusieurs de nos dispositifs est tout à fait possible et devrait améliorer le rendement d'extraction final.

C. Intégration de la capture par affinité

Une capture spécifique a été mise en évidence dans le chapitre précédent (Chapitre 8) pour les trois types cellulaires considérés, GR, GB et PLT, et différentes applications ont été proposées ; la décontamination pour les GR, l'extraction génomique pour les GB et le comptage des PLT. Le point bloquant dans l'intégration de cette capture est l'aspect technologique, c'est-à-dire le couplage entre le packaging d'une chambre à piliers et sa fonctionnalisation avec la chimie de greffage et les anticorps adéquats, qui s'avère être un procédé complexe.

Deux procédés d'intégration sont envisageables, qui varient selon l'ordre des étapes « fonctionnalisation » et « packaging ». Ils sont tous deux présentés dans la Figure XI.11.

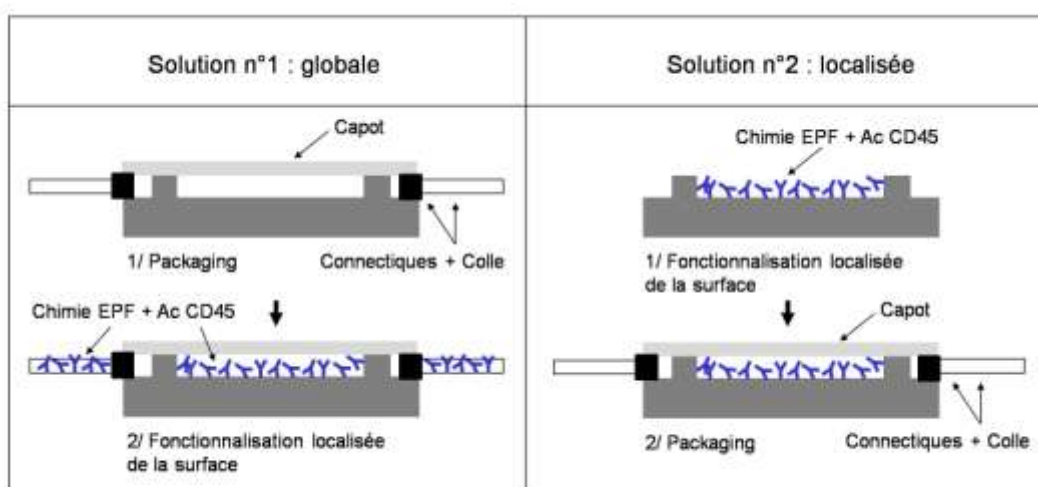


Figure XI.11 : Illustration des deux solutions envisageables pour l'intégration de la capture par affinité.

C.1. Possibilité n°1 : solution globale

La première voie possible consiste en une fonctionnalisation une fois la puce packagée, avec une injection des réactifs successifs par pousse-seringues. Appelons cette solution la solution globale. C'est la technique utilisée dans le laboratoire pour les silanisations par exemple. Elle est donc tout à fait envisageable à court terme. Le problème de la solution globale est qu'elle nécessite un volume important de sondes-Ac. Par ailleurs, les Ac seront accrochés dans l'ensemble du dispositif (c'est-à-dire sur toutes les parois rencontrées) et non pas uniquement dans une chambre bien définie. Etant donné le coût des Ac, cela peut vite devenir une contrainte importante (Volume injecté = 20 μ L). En revanche, cette solution a l'avantage de fournir un dispositif microfluidique étanche puisque celui-ci est packagé de façon classique et maîtrisée.

C.2. Possibilité n°2 : solution localisée

La seconde voie technique envisageable est de fonctionnaliser une surface définie sur la puce non capotée puis, seulement après, de packager l'ensemble de la puce. L'intérêt de cette technique, que nous appellerons la solution localisée, est que la fonctionnalisation ne nécessite qu'un petit volume d'Ac (Volume déposé = 600pL), déposé à la pipette sur une zone bien délimitée. En revanche, la chimie de greffage EPF est particulièrement hydrophobe (pour rappel, $\theta=95^\circ$) et rend le packaging difficile. En effet, les colles successivement utilisées pour le scellement par sérigraphie du capot et pour la connexion des capillaires adhèrent mal sur le substrat silicium ainsi hydrophobe. Il serait également nécessaire de vérifier que les Ac greffés sur la surface de silicium ne seront pas dénaturés par les étapes successives de packaging, en particulier l'insolation de la colle par UV et la réticulation à température ambiante (24 à 48h). Des études sont en cours de développement dans le laboratoire afin d'adapter les protocoles actuels de packaging (sérigraphie et connectique) à la problématique biologique considérée ici.

C.3. Conclusion

Pour conclure quant à l'aspect technique de l'intégration de la capture, rappelons les points essentiels mis en évidence ici. Deux voies sont envisageables. La première solution, dite globale, est la seule actuellement faisable mais elle consomme plus d'Ac. La seconde solution, dite localisée, serait idéale mais son packaging nécessite encore quelques études.

XII. Mise en place d'un nouveau packaging

La connectique est une part essentielle de la technologie microfluidique, puisqu'elle permet le couplage entre le système et le monde qui l'entoure. Il est difficile de définir une solution simple et universelle, qui plus est compatible avec une industrialisation, car chaque type de puce nécessite une connexion qui lui est propre. C'est pourquoi de multiples systèmes de connexion ont été conçus en interne dans les laboratoires de recherche [TAB 03]. La réalisation de la connectique fluidique, étape finale semblant anodine, peut vite devenir une étape besogneuse et opposer une limitation évidente à l'intégration d'un protocole biologique complet [FOU 07]. Ce constat a été souligné à plusieurs reprises au cours de ce travail (Chapitres 7, 8 et 10).

La solution par la tranche que nous avons adoptée jusqu'ici a donc ses limites, en particulier pour des débits importants ; elle nécessite une solution de remplacement. C'est l'objectif de ce Chapitre 12, qui propose la conception et la validation d'un nouveau mode de packaging adapté à nos dispositifs.

A. Contexte

On peut distinguer deux familles de connectiques, par la tranche et par le dessus. La Figure XII.1 présente quelques exemples de solutions plus ou moins commerciales. Celles-ci n'étaient pas directement utilisables dans notre cas.

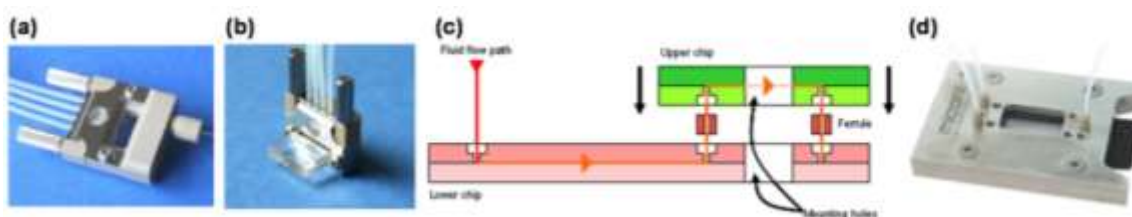


Figure XII.1 : Exemples de solutions de connexion fluidique développées dans l'industrie. (a, b) Connectiques de chez Dolomite Ltd, par la tranche et par le dessus. (c) Connectique de chez Epigem, par le dessus. (d) Connectique de chez Micronite, par le dessus.

Au sein du laboratoire, la connexion par la tranche reste la plus pratiquée. Cette solution consiste à coller directement les capillaires dans les canaux de la puce ; elle est décrite et illustrée au Chapitre 4. Cette connectique présente les avantages d'être facile à mettre en œuvre, fiable (son étanchéité est garantie) et peu encombrante (c'est-à-dire que les capillaires pour l'injection restent en surface et non en volume). Cependant elle comporte quelques inconvénients. Tout d'abord, elle nécessite un temps de préparation assez important (environ 20min par puce + 1 journée à température ambiante pour garantir la bonne réticulation de la colle), une certaine dextérité, ainsi que l'usage d'une colle qui induit ses propres contraintes (biocompatibilité, colle plus ou moins adaptée

pour tel ou tel matériau). De plus, la découpe des puces produit des poussières de silicium qui peuvent s’introduire à l’intérieur des puces et provoquer la contamination des microcanaux.

Mais l’inconvénient majeur de cette connectique par la tranche tient à ce que les diamètres intérieurs des capillaires sont nécessairement inférieurs à ceux des canaux fluidiques de la puce dans lesquels ils sont insérés. Ainsi, les pertes de charge occasionnées sont plus importantes dans la connectique que dans le dispositif lui-même. Il en résulte un temps de stabilisation plus long lors d’une injection par contrôle en débit (Chapitre 8). Et dans le cas des écoulements considérés dans ce travail, les conditions initiales sont faussées. Le dispositif fluidique comporte dès le début une restriction ; la migration latérale est déjà accentuée par cet effet restriction et des recirculations sont visibles en sortie de cette singularité initiale (Chapitre 7).

Afin de remédier à ces différents problèmes, nous avons choisi de développer une nouvelle méthode de connexion fluidique par le dessus. Ce travail a en partie fait l’objet d’un stage ingénieur [PIC 09] encadré durant les derniers mois de ma thèse. Cette section présente l’essentiel des résultats obtenus.

B. Dispositif microfluidique

Afin de valider cette approche, des puces ont été fabriquées par technologie silicium dans le lot BLOD, lancé lors de la troisième année de thèse. Comme dans la section précédente, les motifs utilisés sont adaptés du dispositif F exploité dans le Chapitre 8 pour l’extraction continue du plasma. La géométrie et ses dimensions sont présentées dans la Figure XII.2.

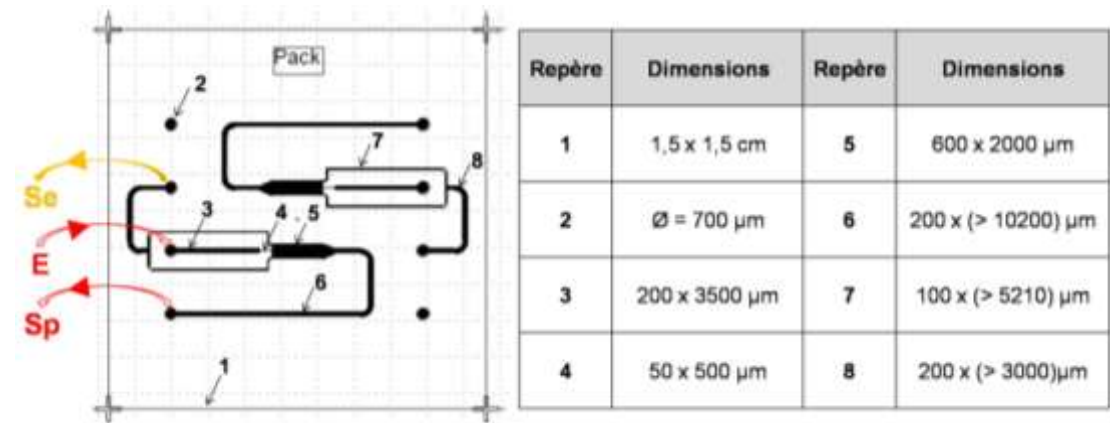


Figure XII.2 : Géométries et dimensions des puces *Pack*, dessinées en vue de l’étude d’un nouveau mode de connexion par le dessus.

Deux motifs identiques sont placés tête bêche sur une même puce. L’échantillon de sang dilué est injecté par le canal d’entrée (E) et sort de la puce par le canal de sortie principale (Sp). Le plasma est collecté dans deux canaux d’extraction placés au niveau des coins de l’élargissement et qui se rassemblent avant leur sortie de la puce (Se). Cette solution permet de garantir l’équilibre entre les deux canaux d’extraction, même en cas de variation de la connectique.

C. Fabrication du packaging

C.1. Spécifications techniques

Les spécifications principales sont les suivantes : le système doit être simple d'utilisation, avec un montage rapide, facile (quelques minutes) et réversible (démontable), facilement nettoyable et étanche jusqu'au moins 2bars, tout en garantissant une connexion reproductible. Par ailleurs, l'encombrement doit être minime afin de permettre l'observation des puces sous le microscope. Enfin, pour que ce packaging soit compatible avec l'utilisation de solutions biologiques, il est préférable que la connectique utilisée soit jetable, pour éviter toute pollution mais également pour des raisons de sécurité vis-à-vis des pathologies éventuellement véhiculées par les échantillons manipulés.

C.2. Solutions envisagées : Connectiques par joint torique

Afin de répondre aux spécifications précédentes et notamment au souhait d'une connectique simple et réversible, nous nous sommes orientés vers un système d'étanchéité par joints toriques. Ces joints peuvent être montés de deux manières différentes, comme détaillé dans le Tableau XII-1.

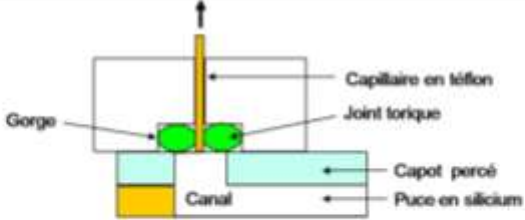

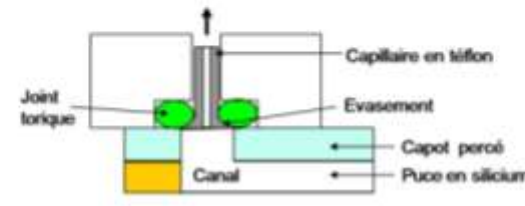

Solution 1 : Joint torique + Gorge	 <p>Capillaire en téflon Joint torique Gorge Capot percé Canal Puce en silicium</p>	
Solution 2 : Joint torique + Colerette	 <p>Capillaire en téflon Joint torique Evasement Capot percé Canal Puce en silicium</p>	 <p>Joint torique Evasement</p>

Tableau XII-1 : Tableau récapitulant les différents modes de connexion envisagés. Dans un souci de simplification schématique, le dessin n'est pas à l'échelle. En effet, le diamètre du canal microfluidique est en réalité plus petit que celui du capillaire de connectique.

Dans les deux cas, les joints sont placés à l'intérieur d'une gorge puis sont comprimés directement sur la puce afin d'assurer l'étanchéité. Ces deux solutions se distinguent l'une de l'autre par la présence d'une collerette dans la solution n°2. Cette collerette, déjà utilisée au sein du laboratoire et dans certains connecteurs commercialisés (appareil à épanoui, Bioblock), présente l'avantage de maintenir le joint lors du montage, et d'augmenter la surface de contact entre le tube et le joint. Cependant, elle impose l'utilisation de tubes aux propriétés élasto-plastiques bien particulières tels que le Téflon. En effet, des tubes trop souples, trop élastiques ou trop rigides, ne permettent pas la fabrication de la collerette.

Pour garantir une bonne étanchéité au système, les joints toriques doivent être comprimés. Un serrage par vis a été prévu à cet effet. Dans les versions ultérieures, une solution clipsée pourra être plus adaptée à un environnement industriel.

C.3. Conception

Le montage du packaging de connexion fluidique comprend différentes étapes, qui sont présentées successivement et illustrées dans la Figure XII.3.

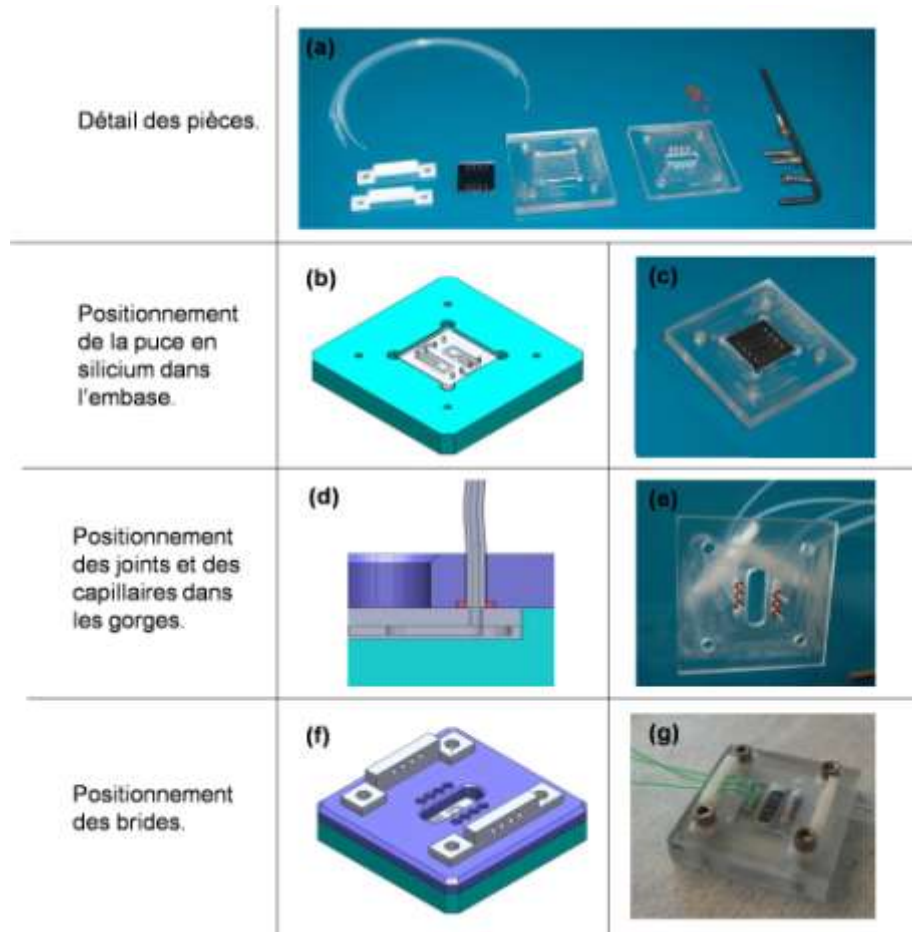


Figure XII.3 : Présentation des étapes successives de montage du packaging de connexion par le dessus.

(1) Tout d'abord, la puce doit être immobilisée dans une embase. La solution choisie utilise une poche de forme carrée, aux coins desquels quatre trous sont percés afin de sortir facilement la puce de son emplacement (Figure XII.3.b et c). La profondeur de cette poche est de 1,725 mm, de manière à ce que la puce affleure au niveau de l'embase (1 mm de capot + 0,725 mm de puce). Cette embase est en polycarbonate car ce matériau est transparent, ce qui permet de visualiser rapidement toute fuite dans le dispositif.

(2) Ensuite, l'ensemble gorges / joints / capillaires doit être monté (Figure XII.3.d et e). Les joints sont en silicone, avec les dimensions suivantes : $\varnothing_{\text{int}}=1$ mm et $\varnothing_{\text{ore}}=0,5$ mm. Les tubes utilisés pour assurer la connexion fluidique sont des capillaires en Téflon dont

les dimensions sont $\varnothing_{\text{int}}=0,56$ mm et $\varnothing_{\text{ext}}=1,07$ mm. Leur diamètre intérieur, proche de celui des trous réalisés dans l'ensemble capot/puce, ne rajoute pas de pertes de charges excessives et perturbe peu la configuration initiale de l'écoulement (pas d'effet restriction ni de recirculations en singularité). Le dernier point critique de ce dimensionnement est la taille des gorges. Leur diamètre intérieur est de 1,90 mm et leur profondeur de 0,2 mm. Ces dimensions sont imposées afin que les joints soient comprimés lors de leur montage.

(3) Deux brides s'ajoutent ensuite au montage précédent (Figure XII.3.f et g). Celles-ci permettent aux tubes de sortir horizontalement afin de faciliter l'observation du système par le dessus. Ces brides ont aussi le rôle de maintenir les tubes et d'éviter leur arrachement durant les manipulations.

C.4. Contrainte de l'utilisation de capots percés

L'injection d'un liquide dans le packaging mis en place ci-dessus nécessite l'utilisation de capots percés. Comme expliqué dans le Chapitre 4, ces capots peuvent être assemblés selon différents procédés. La sérigraphie présente principalement les contraintes suivantes : la nécessité d'une colle biocompatible dans le cas de la manipulation d'éléments biologiques, les éventuels problèmes de visualisation ou de bouchage des canaux inhérents à la formation de ponts de colle et de coulures. C'est pourquoi la filière standard consiste à utiliser des capots percés en verre et à les assembler par scellement anodique sur la plaque de silicium.

Ici, pour des raisons de simplification à court terme, les expériences préliminaires ont dû être réalisées à l'aide de capots en polycarbonate (PC) assemblés par sérigraphie. Le procédé de sérigraphie n'ayant pu être suffisamment optimisé dans le temps imparti, certains canaux étaient bouchés, comme illustré sur la Figure XII.4. Ces puces ont tout de même permis la réalisation de tests d'étanchéité, qui font l'objet de la partie suivante.

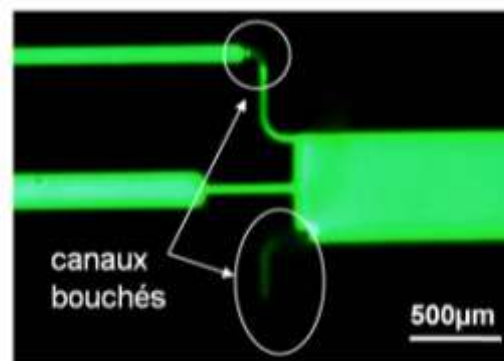


Figure XII.4 : Photographie illustrant les problèmes obtenus après la sérigraphie des capots en polycarbonate sur les puces *Pack*. L'injection visualisée correspond à une solution de fluorescéine observée en fluorescence.

D. Evaluation fluidique du packaging

Deux tests d'étanchéité ont été effectués sur le système ainsi assemblé ; le premier test en mode dynamique et le second en mode statique. Dans les deux cas, ces tests ont été réalisés à l'aide d'une solution constituée d'un mélange d'eau et de colorant alimentaire pour visualiser les fuites éventuelles.

✓ Le test dynamique sert à vérifier que le dispositif assemblé résiste à des débits importants, sans qu'il n'y ait de fuite au niveau de la connectique. Pour cela, l'ensemble des canaux sont connectés et la solution modèle est injectée par l'entrée, avec un débit d'injection croissant, imposé par un pousse-seringues. Les résultats obtenus sont très prometteurs car la connexion fluidique fonctionne convenablement pour un débit d'injection allant jusqu'à 700 μ L/min.

Une injection est réalisée de la même façon avec du sang dilué 1:20. La gamme de débits considérée habituellement avec les dispositifs en PDMS et la connectique par la tranche n'engendre aucune fuite au niveau du packaging. A 100 μ L/min, comme illustré sur la Figure XII.5, les phénomènes de couche appauvrie et de recirculations sont visibles. Il est cependant impossible de caractériser le dispositif d'extraction de façon plus précise car, pour les raisons énoncées précédemment, les canaux d'extraction sont partiellement bouchés et rendent impossible toute mise en équilibre cohérente du système fluidique.

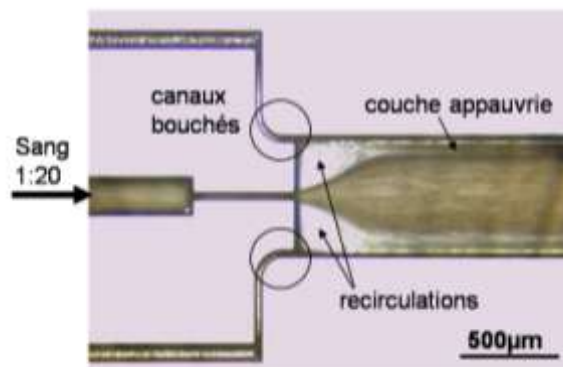


Figure XII.5 : Photographie d'une injection de sang 1:20 à 100 μ L/min dans une puce en silicium avec capot en PC sérigraphié.

✓ Le test statique s'effectue en injectant la solution modèle par l'entrée du dispositif et en bouchant l'ensemble de ses sorties. Un capteur mesure la pression dans le dispositif au fur et à mesure que celle-ci augmente, et permet d'estimer la pression maximale que le système peut supporter. Là-aussi les résultats obtenus sont prometteurs puisque le packaging semble résister jusqu'à une pression de 1,98 bar. Au-delà de cette pression, ce n'est pas la connectique du packaging qui cède, mais la liaison entre le capteur de pression et notre dispositif.

A ce stade, nous n'avons pas noté de différence de comportement entre les deux méthodes de joints (avec ou sans collerette).

E. Conclusion et perspectives

Le packaging mis en place dans cette section pour une connectique par le dessus donne des résultats préliminaires très encourageants : ce packaging est simple d'utilisation, son montage ne nécessite pas plus d'une dizaine de minutes, et les éléments en contact avec des échantillons biologiques sont facilement interchangeables. Différentes méthodes de montage des joints sont envisageables, selon le type de tube choisi. Par ailleurs, le packaging a satisfait aux contraintes de pression initialement imposées.

Comparativement à la connectique classique par la tranche, la connectique par le dessus présente de nombreux avantages : elle ne nécessite pas de colle, le temps de préparation des puces est nettement moins important, et les problèmes de pertes de charge et de perturbations des conditions initiales devraient être résolus. Ainsi la suite des études menées sur ce type de composant devrait de préférence s'orienter vers ce type de connectique.

A court terme, nous pensons que la stabilisation de cette connectique constitue un point clé à résoudre rapidement, afin de donner suite au développement technologique de composants dédiés à la préparation d'échantillon sanguin.

Conclusion

L'échantillon sanguin est un échantillon hétérogène complexe dont les différents constituants font l'objet d'analyses nombreuses et variées. La richesse de cet échantillon explique qu'une préparation préliminaire soit souvent indispensable pour permettre l'analyse d'un élément donné. Il a été mené un état de l'art aux échelles macroscopiques et sur les plans théorique et expérimental. Sur ce dernier plan en particulier, nous avons ainsi pu nous familiariser avec les techniques existantes et leurs contraintes. Un état de l'art analogue aux échelles microscopiques a ensuite été constitué. Il est apparu que le développement d'un système automatisé et miniaturisé permettrait de rendre cette étape essentielle de préparation d'échantillon sanguin plus reproductible, en lui couplant le système d'analyse, et avec un volume adapté à l'analyse ciblée.

Toutes ces études préliminaires ont permis de choisir un type de labopuces qui soit performant et simple ; nous nous sommes ainsi orientés vers les systèmes fondés sur la microfluidique passive et continue. Quelques phénomènes hydrodynamiques connus et rapportés dans la littérature ont été évalués en vue de la micro fragmentation sanguine, tels que la filtration, la sédimentation et la centrifugation. Cependant aucun d'eux n'a semblé adapté pour une fragmentation sanguine globale et efficace à court terme. C'est pourquoi il a fallu imaginer de nouvelles solutions.

Une partie des travaux s'est focalisée sur l'extraction du plasma par microfluidique passive. Une fois les phénomènes fluidiques considérés introduits, des premières tentatives de dispositifs en canal coudé ont été proposées. Ces dernières ont apporté des résultats prometteurs mais nécessitent encore des études plus approfondies pour en prouver la faisabilité. D'autres pistes ont donc été exploitées, fondées sur l'exploitation de la migration latérale dans les écoulements en canal, combinées avec l'introduction de singularités géométriques. Des dispositifs originaux ont été développés, caractérisés, optimisés et biologiquement validés. Ils permettent un rendement d'extraction allant jusqu'à 17,8% pour une injection de sang dilué au 1:20, soit un enrichissement d'un facteur 3 par rapport au dispositif de référence défini.

Les perspectives de ce travail sont tout d'abord l'augmentation du rendement d'extraction. Dans ce but, deux pistes sont envisagées : d'un côté l'optimisation géométrique de nos singularités, avec par exemple un travail plus poussé sur la géométrie des cavités ou sur l'angle d'ouverture de l'élargissement, et d'un autre côté le cumul des rendements par la mise en série ou en parallèle de plusieurs dispositifs optimaux. Une autre perspective envisagée, à plus long terme, est l'application des principes fluidiques considérés ici à la mise en place d'un tri cellulaire par microfluidique passive. En effet, des résultats expérimentaux préliminaires ont apporté des premières conclusions intéressantes sur la répartition des différentes populations cellulaires dans le dispositif optimal.

En parallèle, pour le tri cellulaire, une piste différente de la microfluidique passive mais néanmoins compatible avec elle, a été explorée. Il s'agit de la capture spécifique. En utilisant les compétences de silanisation en interne et la spécificité des interactions

anticorps/antigènes, une accroche a été mise au point pour les GR, les PLT et les GB. Des applications à cette accroche ont été proposées, comme le comptage plaquettaire, l'isolation des GB pour l'extraction génomique ou encore la décontamination d'un plasma en GR résiduels.

Les perspectives de ce travail concernent principalement l'intégration de cette accroche dans une chambre microfluidique afin de réaliser cette accroche en flux et non plus en régime semi-statique.

Enfin, des premières pistes de protocoles intégrables sont décrites à l'aide des solutions de fractionnement qui ont été développées. Une première approche, simple, intégrant l'extraction du plasma et l'analyse, paraît réaliste à court terme. Des expériences préliminaires sont réalisées dans ce sens, avec par exemple la suppression d'un des deux pousse-seringues, le contrôle en pression et la mise en série. Dans le futur, ce travail devrait d'abord commencer par la mise en place d'une preuve de concept de ce labopuces à l'aide d'une application biologique adaptée.

Une seconde approche, plus complexe, de fractionnement global est envisagée mais nécessite des analyses plus poussées. Dans cette perspective, un nouveau mode de packaging a également été mis en place, pour une connectique par le dessus. Il a donné des résultats préliminaires encourageants : il est simple d'utilisation, avec un montage rapide et des éléments en contact avec les échantillons biologiques facilement interchangeables. A court terme, la stabilisation de cette connectique permettra de donner suite au développement de nouvelles techniques de fractionnement sanguin.

Publications et communications

Revues

E. Sollier, M. Cubizolles, Y. Fouillet, J.L. Achard (2009). *Fast and continuous plasma extraction from whole human blood based on expanding cell-free layer devices*. **Biomedical microdevices**, accepté.

E. Sollier, H. Rostaing, P. Pouteau, Y. Fouillet, J.L. Achard (2009). *Passive microfluidic devices for plasma extraction from whole human blood*. **Sensors and Actuators: B. Chemical**, 141: 617-624.

E. Suraniti, E. Sollier, R. Calemczuk, T. Livache, P. N. Marche, M.-B. Villiers, Y. Roupioz (2007). *Real-time detection of lymphocytes binding on an antibody chip using SPR imaging*. **Lab on a Chip**, 7: 1206-1208.

Communications avec comité de lecture

E. Sollier, M. Cubizolles, M. Faivre, Y. Fouillet, J.L., Achard (2009). *A passive microfluidic device for plasma extraction from whole human blood*. **IEEE EMBC**, Minneapolis, USA (oral avec acte).

E. Sollier, M. Faivre, M. Cubizolles, M. Alessio, Y. Fouillet, C. Peponnet, P. Caillat, J.L., Achard (2009). *A microfluidic system to extract plasma from human blood*. **Nanobio**, Grenoble, France (poster, prix du meilleur poster).

E. Sollier, M. Faivre, S. Sadet, M. Cubizolles, G. Nonglaton, F. Vinet, P. Caillat (2009). *Specific capture of blood cells by Ab/Ag binding*. **Nanobio**, Grenoble, France (poster).

E. Sollier, H. Rostaing, Y. Fouillet, J.L. Achard, P. Pouteau (2008). *Passive microfluidic devices for plasma extraction from whole human blood*. **μFlu'08**, Bologna, Italia (oral court + poster avec acte).

E. Sollier, H. Rostaing, Y. Fouillet, J.L. Achard, P. Pouteau (2007). *Hydrodynamic microsystems for non diluted blood fragmentation*. **μTAS**, Paris, France, 733-735 (poster avec acte).

Communications

E. Sollier, H. Rostaing, Y. Fouillet, J.L. Achard, P. Pouteau (2008). *Hydrodynamic microsystems for plasma extraction from whole human blood*. **Minatec Crossroads**, Grenoble, France (poster).

Brevets et extensions

J.L. Achard, E. Sollier, Y. Fouillet, H. Rostaing (2008). *Dispositif et procédé pour la séparation d'une suspension*. Dépôt n° FR 08 025574, déposé le 13 Mai 2008. Extension à l'étranger en cours.

J.L. Achard, E. Sollier, H. Rostaing (2008). *Procédé et dispositif d'extraction d'une phase liquide d'une suspension*. Dépôt n° FR 08 025576, déposé le 13 Mai 2008. Extension à l'étranger en cours.

H. Rostaing, C. Peponnet, P. Pouteau, E. Sollier (2007). *Dispositif de prélèvement sanguin comportant au moins un filtre*. Dépôt n° FR 07 07709, déposé le 02 Novembre 2007. Extension à l'étranger en cours.

Annexes

Annexe 1 : Techniques d'extraction des GB

Afin d'avoir une référence d'extraction des GB, trois techniques communément utilisées en laboratoires d'analyses ont été essayées et comparées : le Buffy Coat, le Tube CPT Vacutainer (BD) et la lyse sélective des GR (Roche).

Le but étant de récupérer les GB en suspension, la technique de capture sur billes CD45 (Dynal) n'a pas été considérée ici car les GB extraits sont accrochés à des billes. Mais cette technique servira de référence lors du développement de solutions fondées sur la capture spécifique dans les Chapitres 9 et 10.

Ces trois techniques sont donc présentées rapidement dans cette annexe puis testées expérimentalement et comparées de façon subjective.

1) Le buffy coat

✓ Principe général

Le buffy coat consiste en l'extraction des GB par centrifugation d'un tube de sang. Les GB et les PLT, plus légers que les GR, se situent à l'interface entre la colonne rouge et le plasma et forment à cet endroit un trait blanchâtre : c'est le buffy coat, schématisé dans la Figure Annexe.1.

✓ Protocole

Le protocole est le suivant : un tube de sang complet est centrifugé à au moins 200g pendant 10min à T° ambiante. Puis le buffy coat est prélevé avec précautions et repris dans du tampon PBS. Le nombre de lavages (au PBS) dépend de la qualité du buffy coat et de la pureté finale voulue.

✓ Mise en œuvre et observations

Cette technique demande beaucoup de dextérité, elle est vraiment difficile à réaliser. En effet, l'anneau du buffy coat est très fin et se situe à la limite des GR. Par conséquent, il est très difficile pour une personne non expérimentée de le prélever sans GR. Une observation au microscope du buffy coat extrait est présentée Figure Annexe.1. L'effet concentration en GB est notable (pas de données quantitatives). Néanmoins, il reste de nombreux GR et PLT, comme le confirment des observations en fluorescence obtenues après marquages spécifiques (photographies non montrées).

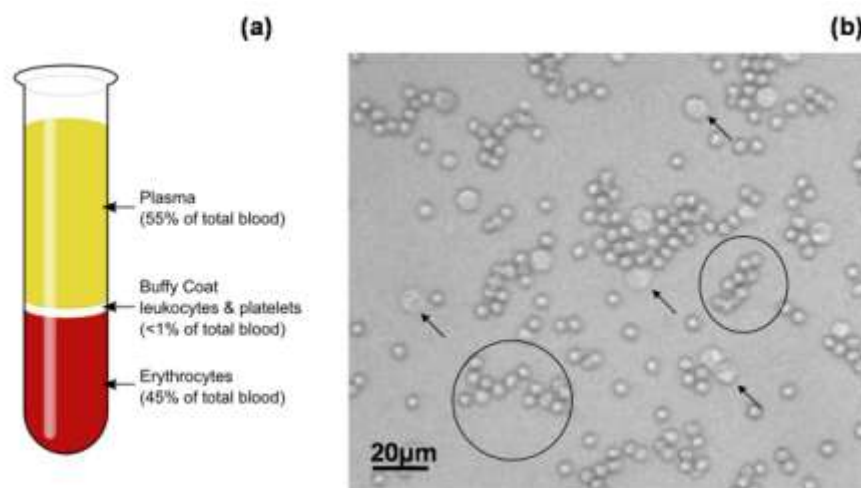


Figure Annexe.1 : Extraction des GB par buffy coat. (a) Principe. (b) Observation au microscope. Les flèches noires indiquent des GB, les ronds noirs en trait plein des GR.

✓ Avantages et inconvénients

☺ : La seule contrainte appliquée aux GB est la centrifugation : la technique est peu destructrice et n'engendre probablement pas d'activation cellulaire. Toutes les catégories de GB sont extraites par cette méthode, c'est-à-dire les mononucléaires et polynucléaires.

☹ : L'inconvénient majeur de cette technique réside dans sa mise en œuvre très difficile. En conséquence, il n'est pas possible d'obtenir un échantillon pur en GB en une seule étape. Des GR et des PLT sont encore présents dans l'échantillon final qui nécessite plusieurs lavages successifs pour un enrichissement en GB plus élevé.

2) Le tube CPT Vacutainer

✓ Principe général

Cette technique reprend l'idée précédente du buffy coat mais en permettant une différenciation accentuée des phases. Le tube CPT Vacutainer de BD contient un séparateur de plasma et un gradient de densité, c'est-à-dire une solution de Ficoll. La séparation des cellules mononucléées (les lymphocytes et les monocytes) du plasma et du culot de GR est réalisée par centrifugation. Elle est obtenue en 20min contre 3 heures en technique classique (c'est-à-dire le Ficoll manuel). Ce principe est présenté dans les Figure Annexe.2.a et c.

✓ Protocole

Le protocole suivi est celui recommandé par BD : le sang est versé dans le tube CPT puis homogénéisé par 8 à 10 retournements et centrifugé 20min à T° ambiante entre 1500 et 1800g. Dans le cas où une pureté importante serait requise, BD suggère au moins deux lavages au PBS (récupération des GB, ajout de 15mL de PBS, homogénéisation par retournements, centrifugation 15min à 300g, récupération du culot cellulaire, ajout de 10mL de PBS et centrifugation 10min à 300g).

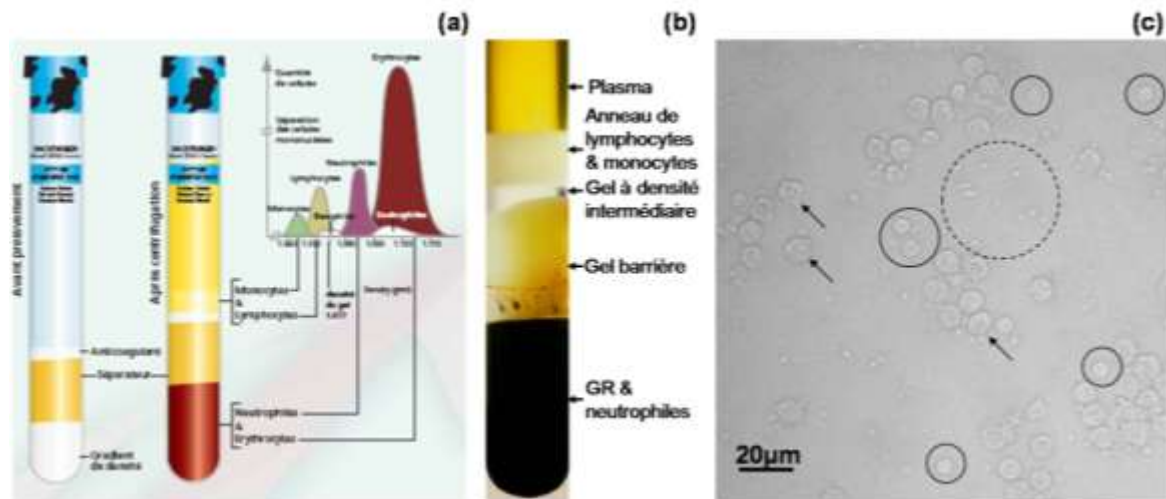


Figure Annexe.2 : Extraction des GB par tube CPT Vacutainer de BD, d'après www.bd.com. (a) Principe. (b) Observation au microscope. Les flèches noires indiquent des GB, les ronds noirs en trait plein des GR, les ronds noirs en pointillés des PLT.

✓ Mise en œuvre et observations

Cette technique est facile à mettre en œuvre et bien expliquée par la documentation BD. Une observation au microscope de l'échantillon extrait est présentée Figure Annexe.2.c. L'effet concentration en GB est très net et plus important que dans le cas du buffy coat car les GR résiduels sont assez rares. Cependant de nombreuses PLT sont visibles comme précédemment.

✓ Avantages et inconvénients

☺ : Le grand avantage de cette technique est, comparativement au buffy coat précédent, la simplification importante de la mise en œuvre. En effet, cette méthode standardisée est simple, rapide (extraction des cellules mononuclées en 20min) et permet un retrait de l'anneau des GB beaucoup plus facile. Par ailleurs, cette technique commerciale est validée et n'active pas ou peu les cellules.

☹ : Son inconvénient est que seuls les mononucléaires sont extraits, les polynucléaires se retrouvant dans le culot cellulaire de GR.

3) La lyse sélective

✓ Principe général

La lyse sélective est la réponse à un choc osmotique. L'osmolarité du tampon et son temps de contact avec les cellules sont contrôlés de manière à lyser les GR et uniquement les GR, avec le moins de perturbations possibles pour les GB. Le protocole Roche, qui est une référence communément utilisée dans la littérature, utilise le Red Cells Blood Lysis Buffer : un tampon formulé pour garantir une lyse optimale des GR tout en gardant intacts les GB. Il comprend principalement de l'ammonium chloride (0.8% NH_4Cl + 0.1mM d'EDTA) pour la lyse et des agents fixants (de nature et composition non fournies) qui permettent de stabiliser les GB.

✓ Protocole

Le protocole suivi est celui recommandé par Roche : 500µL de sang total sont mélangés à 1mL de tampon de lyse et laissés à incuber pendant 10min en agitant le tube régulièrement par inversion. Puis le sang est centrifugé à 2500tr/min pendant 5min. Après avoir prélevé et jeté le surnageant, 1mL de tampon de lyse est rajouté au culot de cellules. La solution est homogénéisée et re-centrifugée à 2500tr/min pendant 3 min. Le surnageant est enlevé et les cellules re-suspendues dans 400µL de PBS (isotonique).

✓ Mise en œuvre et observations

Cette technique est facile à mettre en œuvre et bien expliquée par la documentation Roche. Des observations de l'échantillon extrait au microscope à fluorescence sont présentées dans la Figure Annexe.3, avec un marquage spécifique pour chaque type cellulaire (comme expliqué dans le Chapitre 4).

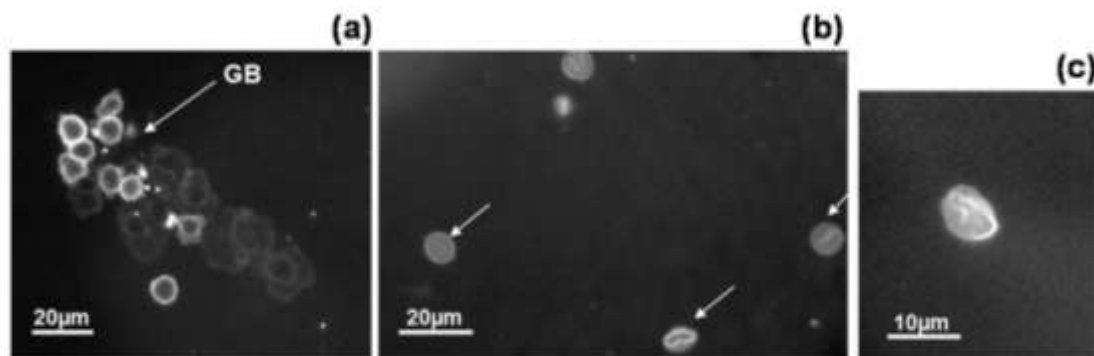


Figure Annexe.3 : Extraction des GB par lyse sélective Roche et photographies obtenues en observation à fluorescence après marquage spécifique. (a) Marquage des GB. (b) Marquage des GR. Les flèches blanches indiquent des fantômes de GR. (c) Zoom sur un fantôme de GR.

Après marquage spécifique, on distingue nettement les GB en fluorescence (a). Ceux-ci se sont rassemblés en amas, probablement suite aux centrifugations successives. La présence des PLT est également confirmée (photographie non montrée), ce qui met en évidence que les PLT semblent survivre au choc osmotique. Après marquage spécifique anti-GR, on distingue en fluorescence des GR vides, non détectables en lumière blanche (b). En réponse au choc osmotique, ils ont ouvert un ou des pores de leur membrane et se sont remplis du liquide environnant, ce qui explique que leur enveloppe, marquée par le CD235a, soit encore visible. On peut noter la présence de « rides » sur la membrane (c), comme un sachet qui aurait été froissé. Malgré les deux centrifugations de rinçage, des fantômes de GR sont encore présents.

✓ Avantages et inconvénients

☺ : Toutes les catégories de GB sont conservées par cette méthode, les mononucléaires et les polynucléaires. Il ne reste plus de GR intacts.

☹ : Cette technique nécessite un contrôle précis de la durée de la réaction. Elle requiert plusieurs interventions de l'utilisateur puisque des lavages sont nécessaires pour rétablir les bonnes conditions osmotiques et enlever un maximum de GR lysés et d'hémoglobine relarguée. A l'issue du protocole, l'échantillon comprend encore des PLT et quelques fantômes des GR. Notons que suivant le tampon de lyse utilisé (avec

de la protéinase K par exemple), il est possible de détruire complètement les membranes des GR, au risque cependant d'activer davantage les GB. L'activation des GB est le grand inconvénient de cette technique même si elle est difficilement quantifiable pour le moment.

4) Comparaison des trois techniques

Les avantages et inconvénients de ces différentes techniques sont récapitulés dans le Tableau Annexe.1.

Techniques	Temps nécessaire	Mise en œuvre	Prix	Mortalité	GB	Pureté PLT	Pureté GR
Buffy Coat	< 20 min	-	Rien	+	-	-	-
Tube CPT (BD)	20 ou 45min (selon pureté requise)	+	8,3 euros 1 tube (8mL)	+	+	-	+
Lyse sélective (Roche)	< 20 min	+	39,34 euros 100mL	-	+	-	-

Tableau Annexe.1 : Extraction des GB et récapitulatif des différentes techniques d'extraction testées.

- Il apparaît que, quelle que soit la technique utilisée, les PLT sont encore présentes dans l'échantillon enrichi en GB. Dans l'état actuel des choses, nous ne savons pas dans quelles mesures ce point est gênant ou non. La contamination en GR est, quant à elle un problème. Du fait de notre difficulté à réaliser un buffy coat correct, le tube CPT est beaucoup plus avantageux puisqu'il permet d'avoir très peu de GR dans l'échantillon extrait par rapport à la contamination obtenue dans le buffy coat.

- L'activation cellulaire et la modification du transcriptome seraient un aspect à considérer mais nous n'avons pas de données quantitatives comparables pour ces trois techniques. Il est cependant possible d'affirmer que les GB sont moins « perturbés » lors des centrifugations des protocoles buffy coat et CPT que lors du choc osmotique de la lyse sélective.

Pour l'ensemble de ces raisons, nous avons choisi comme méthode de référence pour la suite l'extraction des GB par tube CPT.

Il faut noter que dans les trois techniques macroscopiques considérées ici (reconnues et commerciales), aucune n'extrait simplement les GB en suspension et de façon parfaite, ce qui confirme que cette étape est difficile.

Annexe 2 : Explication de l'établissement des écoulements de Dean

Dans un **canal droit** : le profil de la vitesse axiale décroît du centre du canal (où la vitesse est maximale) vers la paroi (où la vitesse est nulle). Ce profil est qualifié de Poiseuille. Il résulte d'un équilibre entre les forces visqueuses résistantes et le gradient de pression moteur, ce dernier étant axial et uniforme dans la section de l'écoulement.

Dans un **canal courbé** : une force centrifuge, proportionnelle au carré de la vitesse axiale, s'applique en plus sur le fluide.

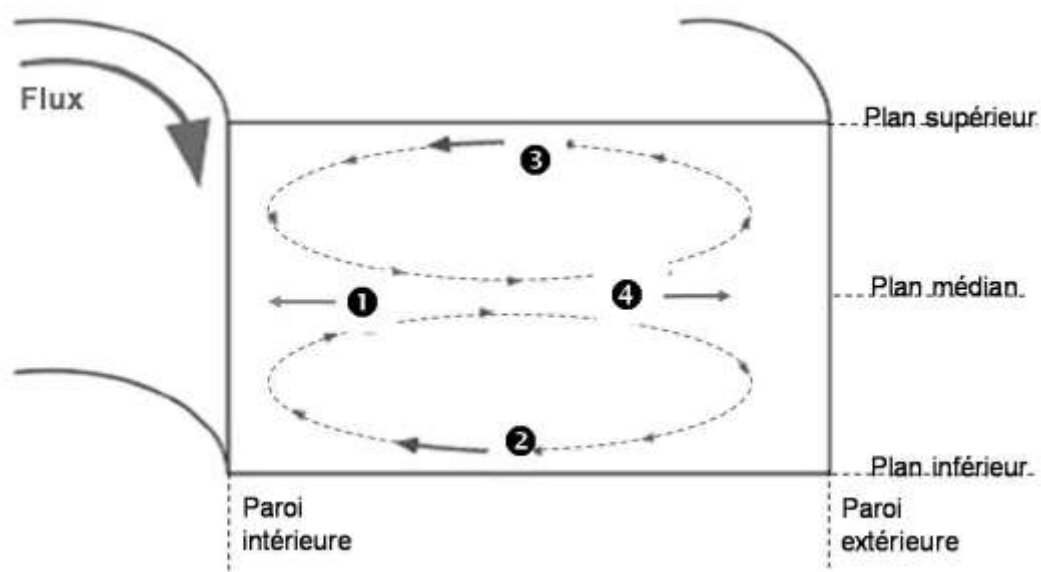


Figure Annexe.4 : Représentation schématique des vortex de Dean.

Montrons ici qualitativement comment s'établit, dans une section du canal, un écoulement secondaire appelé écoulement de Dean qui se superpose à l'écoulement principal axial :

(1) Afin de s'opposer à la force centrifuge, un gradient de pression radial apparaît, dirigé vers le centre de courbure, c'est-à-dire de la paroi extérieure vers la paroi intérieure du coude. La vitesse axiale est maximale au centre du canal (et donc la force centrifuge également) : c'est prioritairement dans cette zone centrale que s'établit cet équilibre gradient de pression radial / force centrifuge (❶).

(2) D'une part, le gradient de pression radial introduit en (1) est approximativement uniforme dans toute la section. En effet, le gradient de pression suivant la hauteur est négligeable. D'autre part, au niveau des parois, la vitesse axiale devient nulle et donc la force centrifuge également.

Par conséquent, le gradient de pression radial au niveau des parois ne peut être compensé que par les forces visqueuses de cisaillement. Celles-ci vont mettre en mouvement le fluide qui circule au voisinage des parois inférieures et supérieures, et le déplacer de l'extérieur vers l'intérieur du coude (❷ et ❸).

(3) Par conservation de la masse, le fluide revient de l'intérieur du canal vers l'extérieur, tout en passant par le plan médian (❹).

En pratique ces différentes étapes se traduisent par l'apparition, dans la section de l'écoulement axial, d'un écoulement secondaire constitué de deux cellules contre-rotatives et appelées cellules de Dean.

Le lecteur intéressé par davantage de détails pourra lire les publications [SUD 06.1, SUD 06.2, OOK 04, OOK 04].

Références bibliographiques

[ABK 08] Abkarian, M. and Viallat, A. (2008). *Vesicles and red blood cells in shear flow*. Soft Matter, **4**, 653-657.

[ABR 90] Abrams, C.S., Ellison, N., Budzynski, A.Z. and Shattil, S.J. (1990). *Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans*. Blood, **75**, 128-138.

[ACH 08.1] Achard, J.L., Sollier, E., Fouillet, Y. and Rostaing, H. (2008). *Dispositif et procédé pour la séparation d'une suspension*. Dépôt n° FR 08 025574, déposé le 13 Mai 2008. Extension à l'étranger en cours.

[ACH 08.2] Achard, J.L., Sollier, E. and Rostaing, H. (2008). *Procédé et dispositif d'extraction d'une phase liquide d'une suspension*. Dépôt n° FR 08 025576, déposé le 13 Mai 2008. Extension à l'étranger en cours.

[ACH 09] Achard, J.L., Rostaing, H. and Pouteau, P. (2009). *Device and method for separation of the components of a suspension in particular of blood*. Dépôt n° PCT WO 2009 024 678, publié le 26.02.2009.

[ADK 02] Adkins, J.N., Varnum, S.M., Auberry, K.JJ, Moore, R.J., Angell, N.H., Smith, R.D., Springer, D.L. and Pounds, J.G. (2002). *Toward a human blood serum proteome, Analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry*. Molecular & Cellular Proteomics, **1**, **12**, 947-955.

[AGI 03] *Reagent kit guide, Protein 50 Assay*. Edition Novembre 2003. Agilent technologies.

[AGR 08] Agrawal, N., Toner, M. and Irimia, D. (2008). *Neutrophil migration assay from a drop of blood*. Lab on a Chip, **8**, 2054-2061.

[ALL 97] Alleborn, N., Nandakumar, K., Raszillier, H. and Durst, F. (1997). *Further contributions on the two-dimensional flow in a sudden expansion*. J. Fluid. Mech., **330**, 169-188.

[AND 77] Anderson, L. and Anderson, N.G. (1977). *High resolution two dimensional electrophoresis of human plasma*. PNAS, **74**, **12**, 5421-5425.

[ASH 87] Ashkin, A., Dziedzic, J.M. and Yamane, T. (1987). *Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams*. Nature, **330**, 769-771.

[ASM 99] Asmolov, E.S. (1999). *The inertial lift on a spherical particle in a plane Poiseuille flow at large channel Reynolds number*. J. Fluid. Mech., **381**, 63-87.

[AUG 07] Augustsson, P., Persson, J., Ohlin, M. and Laurell, T. (2007). *On chip affinity selection of antibodies using ultrasonic standing waves*. Proceedings of μ TAS 2007, October 7-11, 2007, Paris, France, 1810-1812.

[AUR 02] Auroux, P.A., Iossifidis, D., Reyes, D.R. and Manz, A. (2002). *Micro Total Analysis Systems. 2. Analytical standard operations and applications*. Anal. Chem., **74**, 2637-2652.

[BAS 03] Baskurt, O.K. (2003). *Pathophysiological significance of blood rheology*. Turk. J. Med. Sci., **33**, 347-355.

[BD 02] *BD FACSCalibur Flow cytometer, the automated, multicolor flow cytometry system. A complete system for today's laboratory*. Edition Juin 2002. BD Biosciences.

- [BD 08] *BD Vacutainer, Tube Guide*. Edition Avril 2008. BD Biosciences.
- [BEL 03] Belov, L., Huang, P., Barber, N., Mulligan, S.P. and Christopherson, R.I. (2003). *Identification of repertoires of surface antigens on leukemias using an antibody microarray*. *Proteomics*, **3**, 2147-2154.
- [BEE 08] Beech, J.P. and Tegenfeldt, J.O. (2008). *Tuneable separation in elastomeric microfluidics devices*. *Lab on a Chip*, **8**, 657-659.
- [BER 83] Bergern S.A., Talbot, L. and Yao, L.S. (1983). *Flow in curved pipes*. *Annu. Rev. Fluid. Mech.*, **15**, 461-512.
- [BHA 08] Bhagat, A.A.S., Kuntaegowdanahalli, S.S. and Papautsky, I. (2008). *Continuous particle separation in spiral microchannels using dean flows and differential migration*. *Lab on a Chip*, **8**, 1906-1914.
- [BRE 62] Bretherton, F. (1962). *The motion of rigid particles in a shear flow at low Reynolds number*. *J. Fluid. Mech.*, **14**, 284-304.
- [BRO 93] Brown, B. A. (1993). *Hematology: Principles and Procedures*, 6th edition. Lippincott Williams & Wilkins.
- [CHA 79] Chan, P.C.H. and Leal, L.G. (1979). *The motion of a deformable drop in a second order fluid*. *J. Fluid. Mech.*, **92**, 131-170.
- [CHA 00] Chang, K.C., Tees, D.F.J. and Hammer, D.A. (2000). *The state diagram for cell adhesion under flow: leukocyte rolling and firm adhesion*. *PNAS*, **97**, 11262-11267.
- [CHA 05] Chang, W.C., Lee, L.P. and Liepmann, D. (2005). *Biomimetic technique for adhesion-based collection and separation of cells in a microfluidic channel*. *Lab on a Chip*, **5**, 64-73.
- [CHE 06] Chérif B., Roget A., Villiers C., Calemczuk R., Leroy V., Marche P., Livache T. and Villiers, M.B. (2006). *Clinically related protein-peptide interactions monitored in real-time on novel peptide chips using surface plasmon resonance imaging*. *Clinical Chem.*, **54**, 255-262.
- [CHE 07] Cheng, X., Irimia, D., Dixon, M., Sekine, K., Demirci, U., Zamir, L., Tompkins, R.G., Rodriguez, W. and Toner, M. (2007). *A microfluidic device for practical label-free CD4+ T cell counting of HIV-infected subjects*. *Lab on Chip*, **7**, 170-178.
- [CHE 07.2] Chen, X., Cui, D., Liu, C., Li, H. and Chen, J. (2007). *Continuous flow microfluidic device for cell separation, cell lysis and DNA purification*. *Analytica Chimica Acta*, **584**, 237-243.
- [CHE 08] Chen, X., Cui, D.F., Liu, C.C. and Li, H. (2008). *Microfluidic chip for blood cell separation and collection based on cross-flow filtration*. *Sensors and Actuators: B. Chemical*, **130**, 216-221.
- [CHE 09] Chen, X., Cui, D. and Zhang, L. (2009). *Isolation of plasma from whole blood using a microfluidic chip in a continuous cross-flow*. *Chinese Science Bulletin*, **54**, **2**, 324-327.
- [CHE 09.2] Cheng, X., Gupta, A., Chen, C., Tompkins, R.G., Rodriguez, W. and Toner, M. (2009). *Enhancing the performance of a point-of-care CD4+ T-cell counting microchip through monocyte depletion for HIV/AIDS diagnostics*. *Lab on a Chip*, **9**, 1357-1364.
- [CHI 87] Chien S. (1987). *Red cell deformability and its relevance to blood flow*. *Ann. Rev. Physiol.*, **49**, 177-192.
- [CHI 07] Chiu, D.T. (2007). *Cellular manipulations in microvortices*. *Anal. Bioanal. Chem.*, **387**, 17-20.
- [CHI 07.2] Chin, C.D., Linder, V. and Sia, S.K. (2007). *Lab-on-a-chip devices for global health: Past studies and future opportunities*. *Lab on a Chip*, **7**, 41-57.

- [CHO 04] *ALT-AST (GPT-GOT), Alanine Aminotransferase (Glutamate Pyruvate Transaminase) and Aspartate Aminotransferase (Glutamate Oxaloacetate Transaminase) test cassette*. Edition 2004. Cholestech LDX Systems.
- [CHO 05] Choi, S. and Park, J.K. (2005). *Microfluidic system for dielectrophoretic separation on a trapezoidal electrode array*. Lab on a Chip, **5**, 1161-1167.
- [CHO 07] *Alanine Aminotransferase (ALT) and Aspartate Aminotransferase (AST)*. Technical Bulletin, Number 114. Edition 2007. Cholestech LDX Systems.
- [CHO 07.2] Cho, Y.K., Lee, J.G., Park, J.M., Lee, B.S., Lee, Y. and Ko, C. (2007). *One-step pathogen specific DNA extraction from whole blood on a centrifugal microfluidic device*. Lab on a Chip, **7**, 565-573.
- [CHO 07.3] Choi, S. and Park, J.K. (2007). *Sheathless particle focusing based on hydrophoresis and its application to blood plasma separation*. Proceedings of μ TAS 2007, October 7-11, 2007, Paris, France, 1486-1488.
- [CHO 07.4] Choi, S., Song, S., Choi, C. and Park, J.K. (2007). *Continuous blood cell separation by hydrophoretic filtration*. Lab on a Chip, **7**, 1532-1538.
- [COL 04] Colin, S. (2004). *Microfluidique*. Hermes Science Publications.
- [CRI 68] Cripps, C. M. (1968). *Rapid method for the estimation of plasma haemoglobin levels*. J. Clin. Pathol., **21**, 110-112.
- [CRO 05] Crowley, T.A. and Pizziconi, V. (2005). *Isolation of plasma from whole blood using planar microfilters for lab-on-a-chip applications*. Lab on a Chip, **5**, 922-929.
- [DAS 05] Das, C.M., Becker, F., Vernon, S., Noshari, J., Joyce, C. and Gascoygne, P.R.C. (2005). *Dielectrophoretic segregation of different human cell types on microscope slides*. Anal. Chem., **77**, 2708-2719.
- [DAV 06] Davis, J.A., Inglis, D.W., Morton, K.J., Lawrence, D.A., Huang, L.R., Chou, S.Y., Sturm, J.C. and Austin, R.H. (2006). *Deterministic hydrodynamics: Taking blood apart*. PNAS, 103, **40**, 14779-14784.
- [DEL 08] Delapierre, G. (2008). *Les micro et nano technologies, chimie des interfaces*. Cours donné à l'Ecole Centrale de Marseille.
- [DEM 03] De Mello, A.J. and Beard, N. (2003). *Dealing with 'real' samples: sample pre-treatment in microfluidic systems*. Lab on a Chip, **3**, 11N-19N.
- [DHO 08] Dholokia, K., Reece, P. and Gu, M. (2008). *Optical manipulation*. Chem. Soc. Rev., **37**, 42-55.
- [DIC 07] Di Carlo, D., Irimia, D., Tompkins, R.G. and Toner, M. (2007). *Continuous inertial focusing, ordering, and separation of particles in microchannels*. PNAS, **104**, 18892-18897.
- [DYN 06] *Human cell separation and expansion with Dynabeads*. Edition Avril 2006. Dynal, Invitrogen.
- [DYN 08] *Dynabeads CD45*. Edition Octobre 2008. Dynal, Invitrogen.
- [EAS 06] Easley, C.J., Karlinsey, J.M., Bienvenue, J.M., Legendre, L.A., Roper, M.G., Feldman, S.H., Huhghes, M.A., Hewlett, E.L., Merkel, T.J., Ferrance, J.P. and Landers, J.P. (2006). *A fully integrated microfluidic genetic analysis system with sample-in-answer-out capability*. PNAS, **103**, 19272-19277.
- [EVA 72] Evans, E.A. and Fung, Y.C. (1972). *Improved measurements of the erythrocyte geometry*. Microv. Res., **4**, 335-347.

- [EVA 76] Evans, E.A., Waugh, R. and Melnik, L. (1976). *Elastic area compressibility modulus of red cell membrane*. Biophys. J., **16**, 585-595.
- [EVA 84] Evans, E. and Leung, A. (1984). *Adhesivity and rigidity of erythrocyte membrane in relation to wheat germ agglutinin binding*. The Journal of Cell Biology, **98**, 1201-1208.
- [FAI 06] Faivre, M., Abkarian, M., Bickraj, K. and Stone, H.A (2006). *Geometrical focusing of cells in a microfluidic device: an approach to separate blood plasma*. Biorheology, **43**, 147-159.
- [FAN 08] Fan, R., Vermesh, O., Srivastava, A., Yen, B.K.H., Qin, L., Ahmad, H., Kwong, G.A., Liu, C.C., Gold, J., Hood, L. and Heath, J.R. (2008). *Integrated barcode chips for rapid, multiplexed analysis of proteins in microliter quantities of blood*. Nature biotechnology, 26, **12**, 1373-1378.
- [FEL 03] Felton, J.M. (2003). *CD Simplicity, Compact disc-based fluidics is an evolving form of lab-on-a-chip technology*. American Chemical Society, November 2003, Modern Drug Discovery, 35-39.
- [FEN 06] Fenneteau, O., Hurtaud-Roux, M.F. and Schlegel, N. (2006). *Aspect cytologique normal et pathologique du sang chez le nouveau-né et le jeune enfant*. Ann. Biol. Clin., **64**, 1, 17-36.
- [FIS 04] Fischer, T.M. (2004). *Shape memory of human red blood cells*. Biophysical Journal, **86**, 3304-3313.
- [FOL 00] Folch, A., Jo, B.H., Hurtado, O., Beebe, D.J. and Toner, M. (2000). *Microfabricated elastomeric stencils for micropatterning cell cultures*. J. Biomedical Materials Research, **52**, 346-353.
- [FOU 06] Fouillet, Y., Jary, D., Brachet, A.G., Berthier, J., Blervaque, R., Davoust, L., Roux, J.M., Achard, J.L. and Peponnet C. (2006). *Ewod digital microfluidics for lab on a chip*. Proceedings of ASME ICNMM 2006, June 19-21, 2006, Limerick, Ireland, 96020.
- [FOU 07] Fouillet, Y. (2007). *Microfluidique discrète sous champ électrique et labopuces*. Mémoire d'habilitation à diriger des recherches.
- [FOU 08] Fouillet, Y., Jary, D., Chabrol, C., Claustre, P. and Peponnet, C. (2007). *Digital microfluidic design and optimization of classic and new fluidic functions for lab on a chip systems*. Microfluid. Nanofluid., **4**, 159-165.
- [FU 02] Fu, A.Y., Chou, H.P., Spence, C., Arnold, F.H. and Quake, S.R. (2002). *An integrated microfabricated cell sorter*. Anal. Chem., **74**, 2451-2457.
- [FUR 04] Furdui, V.I. and Harrison, D.J. (2004). *Immunomagnetic T cell capture from blood for PCR analysis using microfluidic systems*. Lab on a Chip, **4**, 614-618.
- [GER 06] Gervais, T., El-Ali, J., Guenther, A. and Jensen, K.F. (2006). *Flow-induced deformation of shallow microfluidic channel*. Lab on a Chip, **6**, 500-507.
- [GOL 68] Goldsmith, H.L (1968). *The microrheology of red blood cell suspensions*. J. General Physiology, **52**, 5-28.
- [GOL 84] Goldsmith, H.L. and Spain, S. (1984). *Margination of leukocytes in blood flow through small tubes*. Microvasc. Res., **27**, 204-222.
- [GOL 77] Goldsmith, HL and Karino, T (1977). *Microscopic considerations: the motions of individual particles*. Annals of the New York Academy of Sciences, **283**, 241-255.
- [GRE 07] Gregoratto, I., McNeil, C.J. and Reeks, M.W. (2007). *Micro devices for rapid continuous separation of suspensions for use in micro-total-analysis-systems*. Proceedings of SPIE, 646503.
- [GRO 05] Grosjean, L., Cherif, B., Mercey, E., Roget, A., Levy, Y., Marche, P.N., Villiers, M.B. and Livache, T. (2005). *A polypyrrole protein microarray for antibody-antigen interaction studies using a label-free detection process*. Analytical Biochemistry, **347**, 193-200.

- [GRU 06] Grumann, M., Steigert, J., Riegger, L., Moser, L., Enderle, B., Riebeseel, K., Urban, G., Zengerle, R. and Ducree, J. (2006). *Sensitivity enhancement for colorimetric glucose assays on whole blood by on-chip beam-guidance*. Biomed. Microdevices, **8**, 209-214.
- [GUZ 08] Guzman, N.A., Blanc, T. and Phillips, T.M. (2008). *Immunoaffinity capillary electrophoresis as a powerful strategy for the quantification of low-abundance biomarkers, drugs, and metabolites in biological matrices*. Electrophoresis, **29**, 3259-3278.
- [HAC] Hachulla, E., Hennache, B. *VS élevée*. Rapport interne disponible sur internet, CHRU Lille.
- [HAE 06] Haeberle, S., Brenner, T., Zengerle, R., and Ducrée, J. (2006). *Centrifugal extraction of plasma from whole blood on a rotating disk*. Lab on a Chip **6**, 776-781.
- [HAE 07] Haeberle, S. and Zengerle, R. (2007). *Microfluidic platforms for lab-on-a-chip applications*. Lab on a Chip, **7**, 1094-1110.
- [HAN 04] Han, K.H. and Frazier, A.B. (2004). *Continuous magnetophoretic separation of blood cells in microdevice format*. Journal of Applied Physics, **96**, 5797-5802.
- [HAN 06.1] Han, K.H. and Frazier, A.B. (2006). *Paramagnetic capture mode magnetophoretic microseparator for high efficiency blood cell separations*. Lab on a Chip, **6**, 265-273.
- [HAN 06.2] Han, K.H., Han, A. and Frazier, A.B. (2006). *Microsystems for isolation and electrophysiological analysis of breast cancer cells from blood*. Biosensors and Bioelectronics, **21**, 1907-1914.
- [HAN 08] Han, K.H. and Frazier, A.B. (2008). *Lateral driven continuous dielectrophoretic microseparators for blood cells suspended in a highly conductive medium*. Lab on a Chip, **8**, 1079-1086.
- [HAR 09] Hardy, B. S., Uechi, K., Zhen, J. and Kavehpour, H. P. (2009). *The deformation of flexible PDMS microchannels under a pressure driven flow*. Lab on a Chip, **9**, 935-938.
- [HAW 01] Hawa, T. and Rusak, Z. (2001). *The dynamics of a laminar flow in a symmetric channel with a sudden expansion*. J. Fluid. Mech., **436**, 283-320.
- [HAW 04] Hawkes, J.J., Barber, R.W., Emerson, D.R. and Coakley, W.T. (2004). *Continuous cell washing and mixing driven by an ultrasound standing wave within a microfluidic channel*. Lab on a Chip, **4**, 446-452.
- [HEL 08] Heller, M. and Bruus, H. (2008). *A theoretical analysis of the resolution due to diffusion and size dispersion of particles in deterministic lateral displacement devices*. J. Micromech. Microeng., **18**, 075030.1-075030.6.
- [HEN 08] Henares, T.G., Mizutani, F. and Hisamoto, H. (2008). *Current development in microfluidic immunosensing chip*. Analytica Chimica Acta, **611**, 17-30.
- [HON 05] Honda N., Lindberg, U., Andersson, P., Hoffmann, S. and Takei, H. (2005). *Simultaneous multiple immunoassays in a compact disc-shaped microfluidic device based on centrifugal force*. Clinical Chemistry, **51**, 1955-1961.
- [HUA 08] R. Huang, R., Barber, T.A., Schmidt, M.A., Tompkins, R.G., Toner, M., Bianchi, D.W., Kapur, R. and Flejter, W.L. (2008). *A microfluidics approach for the isolation of nucleated red blood cells (NRBCs) from the peripheral blood of pregnant women*. Prenat Diagn, **28**, 892-899.
- [HWA 08] Hwang, K.Y., Lim, H.K., Jung, S.Y., Namkoong, K., Kim, J.H., Huh, N., Ko, C. and Park, J.C. (2008). *Bacterial DNA sample preparation from whole blood using surface-modified Si pillar arrays*. Anal. Chem., **80**, 7786-7791.

- [ING 04] Inglis, D.W., Riehn, R., Austin, R.H. and Sturm, J.C. (2004). *Continuous microfluidic immunomagnetic cell separation*. Applied Physics Letters, **85**, 5093-5095.
- [ING 06] Inglis, D.W., Davis, J.A., Austin, R.H. and Sturm, J.C. (2006). *Critical particle size for fractionation by deterministic lateral displacement*. Lab on a Chip, **6**, 655-658.
- [ING 09] Inglis, D.W. (2009). *Efficient microfluidic particle separation arrays*. Applied Physics Letter, **94**, 013510.
- [JAG 07] Jäggi, R.D., Sandoz, R. and Effenhauser, C.S. (2007). *Microfluidic depletion of red blood cells from whole blood in high-aspect-ratio microchannels*. Microfluid. Nanofluid., **3**, 47-53.
- [JI 06] Ji, H. M., Samper, V., Yobas, L., Chen, Y., Heng, C. K. And Lim, T. M. (2006). *Silicon based microfilters for whole blood cell separation*. Proceedings of μ TAS 2006, November 5-9, 2006, Tokyo, Japan, 323-325.
- [JI 08] Ji, H. M., Samper, V., Chen, Y., Heng, C. K., Lim, T. M. and Yobas, L. (2008). *Silicon based microfilters for whole blood cell separation*. Biomed. Microdevices, **10**, 251-257.
- [JIN 07] Jin, Q., Verdier, C., Singh, P., Aubry, N., Chotard-Ghodsnia, R. and Duperray, A. (2007). *Migration and deformation of leukocytes in pressure driven flows*. Mechanics Research Communications, **34**, 411-422.
- [KER 08] Kersaudy-Kerhoas, M., Dhariwal, R. and Desmulliez, M.P.Y. (2008). *Recent advances in microparticle continuous separation*. IET Nanobiotechnol., **2**, 1-13.
- [KER 09] Kersaudy-Kerhoas, M., Dhariwal, R., Desmulliez, M.P.Y. and Jouvet, L. (2009). *Hydrodynamic blood plasma separation in microfluidic channels*. Microfluid Nanofluid. DOI 10.1007/s10404-009-0450-5.
- [KHA 81] Khalifa, A.M. and Giddens, D.P. (1981). *Characterization and evolution of post stenotic flow disturbances*. J. Biomech., **14**, 279-296.
- [KHA 04] Khademhosseini, A., Yeh, J., Jon, S., Eng, G., Suh, K.Y., Burdick, J.A. and Langer, R. (2004). *Molded polyethylene glycol microstructures for capturing cells within microfluidic channels*. Lab on a Chip, **4**, 425-430.
- [KIM 06] Kim, D.S., Lee, S.H., Ahn, C.H., Lee, J.Y., Kwon, T.H. (2006). *Disposable integrated microfluidic biochip for blood typing by plastic microinjection moulding*. Lab on a Chip, **6**, 794-802.
- [KIM 08] Kim, S.M., Lee, S.H. and Suh, K.Y. (2008). *Cell research with physically modified microfluidic channels: a review*. Lab on a Chip, **8**, 1015-1023.
- [KNA 89] Knapp, W., Dörken, B., Gilks, W.R., Riebern E.P., Schmidt, R.E., Stein, H. and Kr. von dem Borne, A.E.G. (1989). *Leucocyte typing IV: White cell differentiation antigens*. New York, NY: Oxford University Press, 628-634.
- [KOH 99] Kohler, J. M., Mejevaia, T., Saluz, H. P. (1999). *Microsystem technology: a powerful tool for biomolecular studies*. Collection BioMethods, Edition Birkhäuser.
- [KOT 07] Kotz, K.T., Russom, A., Irimia, D., Mindrinos, M.N., Moldawer L.L., Tompkins, R.G. and Toner, M. (2007). *Microfluidic cassette for rapid isolation and processing of leukocyte subpopulations from whole blood*. Proceedings of μ TAS 2007, October 7-11, 2007, Paris, France, 155-157.
- [KU 97] Ku, D.N. (1997). *Blood flow in arteries*. Annu. Rev. Fluid. Mech., **29**, 399-434.
- [LAR 06] Larsen, A.V., Beech, J.P., Ozkapici, V., Bilenberg, B., Kristensen, A. and Tegenfeldt, J.O. (2006). *Pushing the limits of deterministic lateral displacement devices*. Proceedings of μ TAS 2006, November 5-9, 2006, Tokyo, Japan, 930-932.

- [LAW 67] Lawler, M.T. and Lu, P.C. (1967). *The role of lift in the radial migration of particles in a pipe flow*. In : Advances of Solid-Liquid flow in pipes and its application, Pergamon Press Ltd. Oxford, New York, 39-57.
- [LED 89] Le Devehat, C., Vimeux, M., Bondoux, G. and Bertrand, A. (1989). *Hemorheological factors in the pathophysiology of venous diseases*. Clin. Hemorheol., **9**, 2, 237-246.
- [LEN 01] Lenormand G. (2001). *Elasticité du squelette du globule rouge humain, une étude par pinces optiques*. Mémoire de thèse.
- [LEN 09] Lenshof, A., Ahmad-Tajudin, A., Järas, K., Swärd-Nilsson, A.M., Aberg, L., Marko-Varga, G., Malm, J., Lilja, H. and Laurell T. (2009). *Acoustic whole blood plasmapheresis chip for prostate specific antigen microarray diagnostics*. Anal. Chem., **81**, 6030-6037.
- [LER 09] Le Roy, A. (2009). *Capture d'entités biologiques dans un microréacteur fluidique*. Rapport de stage ingénieur.
- [LI 07] Li, N., Kamei, D.T. and Ho, C.M. (2007). *On-chip continuous blood cell subtype separation by deterministic lateral displacement*. Proceedings of IEEE MEMS 2007, January 16-19, 2007, Bangkok, Thailand, 932-936.
- [LI 08] Li, JM, Liu, C, DaiXD, Chen, HH, Liang, Y, Sun, HL, Tian, H, Ding, XP (2008). *PMMA microfluidic device with three dimensional features for blood cell filtration*. Journal of micromechanics and microengineering, **18**, 095021.
- [LIC 02] Lichtenberg, J., de Rooij, N.F. and Verpoorte, E. (2002). *Sample pretreatment on microfabricated devices*. Talanta, **56**, 233-266.
- [LIU 04] Liu, R.H. and Yang, J. (2004). *Self-contained fully integrated biochip for sample preparation, polymerase chain reaction amplification, and DNA microarray detection*. Anal. Chem., **76**, 1824-1832.
- [LON 08] Long, B.R., Heller, M., Beech, J.P., Linke, H., Bruus, H. and Tegenfeldt, J.O. (2008). *Multi-directional sorting modes in deterministic lateral displacement devices*. Physical review, **78**, 046304.
- [LYO 07] Lyons, P.A, Koukoulaki, M., Hatton, A., Doggett, K., Woffendin, H.B., Chaudhry, A.N. and Smith K.G.C. (2007). *Microarray analysis of human leucocyte subsets: the advantages of positive selection and rapid purification*. BMC Genomics, **8**, 64.
- [MAC 02] Mac Donald, J.C. and Whitesides, G.M. (2002). *Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices*. Accounts of chemical research, 35, **7**, 491-499.
- [MAC 03] Mac Donald, M.P., Spalding, G.C. and Dholokia, K. (2003). *Microfluidic sorting in an optical lattice*. Nature, **426**, 421-424.
- [MAD 02] Madou, M. (2002). *Fundamentals of microfabrication: the science of miniaturization, second edition*. Taylor & Francis, Inc.
- [MAN 08] Manbachi, A., Shrivastava, S., Cioffi, M., Chung, B.G., Moretti, M., Demirci, U., Yliperttula, M. and Khademhosseini, A. (2008). *Microcirculation within grooved substrates regulates cell positioning and cell docking inside microfluidic channels*. Lab on a Chip, **8**, 747-754.
- [MAR 08] Mariella, R. (2008). *Sample preparation: the weak link in microfluidics-based biodetection*. Biomed. Microdevices, **10**, 777-784.
- [MCH 01] Mchedlishvili, G. and Maeda, N. (2001). *Blood flow structure related to red cell flow: a determinant of blood fluidity in narrow microvessels*. Japanese Journal of Physiology, **51**, 19-30.
- [MEN 07] Meng Z. and Veenstra T.D. (2007). *Proteomic analysis of serum, plasma, and lymph for the identification of biomarkers*. Proteomics Clin. Appl., **1**, 747-757.

- [MIR 09] Miranda, J.M., Teixeira, J., Vicente, A., Correia, H. and Minas, G. (2009). *Improving alternate flow mixing by obstacles located along a microchannel*. Proceedings of IEEE EMBC 2009, September 2-6, 2009, Minneapolis, USA, 7034-7036.
- [MOF 64] Moffatt, H.K. (1967). *Viscous and resistive eddies near a sharp corner*. J. Fluid. Mech., **18**, 1-18.
- [MOR 06] Morton, K.J., Sturm, J.C., Austin, R.H., Chou, S.Y. (2006). *Nanoimprinted fluidic device for continuous separation of nanoparticles*. Proceedings of μ TAS 2006, November 5-9, 2006, Tokyo, Japan, 1014-1016.
- [MOR 08] Morton, K.J., Loutharback, K., Inglis, D.W., Tsui, O.K., Sturm, J.C., Chou, S.Y. and Austin, R.H. (2008). *Crossing microfluidic streamlines to lyse, label and wash cells*. Lab on a Chip, **8**, 1448-1453.
- [MUR 04] Murthy, S.K., Sin, A., Tompkins, R.G. and Toner, M. (2004). *Effect of flow and surface conditions on human lymphocyte isolation using microfluidic chambers*. Langmuir, **20**, 11649-11655.
- [NAG 07] Nagraath, S., Sequist, L.V., Maheswaran, S., Bell, D.W., Irimia, D., Ulkus, L., Smith, M.R., Kwak, E.L., Digumarthy, S., Muzikansky, A., Ryan, P., Balis, U.J., Tompkins, R.G., Haber, D.A. and Toner, M. (2007). *Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology*. Nature, **450**, 1235-1239.
- [NAK 07] Nakashima, Y. and Yasua, T. (2007). *Blood plasma extraction from a minute amount of blood using dielectrophoresis*. Proceedings of μ TAS 2007, October 7-11, 2007, Paris, France, 706-708.
- [NIL 04] Nilsson, A., Petersson, F., Jönsson, H. and Laurell, T. (2004). *Acoustic control of suspended particles in micro fluidic chips*. Lab on a Chip, **4**, 131-135.
- [NIL 06] Nilsson, A., Petersson, F. and Laurell, T. (2006). *Whole blood plasmapheresis using acoustic separation chips*. Proceedings of μ TAS 2006, November 5-9, 2006, Tokyo, Japan, 314-316.
- [OLL 97] Olla, P. (1997). *The lift on a tank-treading ellipsoidal cell in a shear flow*. J. Phys. France II, **7**, 1533-1540.
- [OOK 04] Ookawara, S., Higashi, R., Street, D. and Ogawa, K. (2004). *Feasibility study on concentration of slurry and classification of contained particles by microchannel*. Chemical Engineering Journal, **101**, 171-178.
- [OOK 06] Ookawara, S., Street, D. and Ogawa, K. (2006). *Numerical study on development of particle concentration profiles in a curved microchannel*. Chemical Engineering Science, **61**, 3714-3724.
- [ORS 01] Orsello, C.E., Lauffenburger, D.A. and Hammer, D. (2001). *Molecular properties in cell adhesion: a physical and engineering perspective*. Trends in Biotechnology, **19**, 310-316.
- [PAM 04] Pamme, N. and Manz, A. (2004). *On-chip free-flow magnetophoresis: continuous flow separation of magnetic particles and agglomerates*. Anal. Chem., **76**, 7250-7256.
- [PAM 06] Pamme, N. (2006). *Magnetism and microfluidics*. Lab on a Chip, **6**, 24-38.
- [PAM 07] Pamme, N. (2007). *Continuous flow separations in microfluidic devices*. Lab on a Chip, **7**, 1644-1659.
- [PAN 05] Panaro, N.J., Lou, X.J., Fortina, P., Kricka, L.J. and Wilding, P. (2005). *Micropillar array chip for integrated white blood cell isolation and PCR*. Biomolecular Engineering, **21**, 157-162.
- [PAP 07] Pappas, D. and Wang, K. (2007). *Cellular separations: a review of new challenges in analytical chemistry*. Analytica Chimica Acta, **601**, 26-35.

- [PAR 05] Park, J, Cho, K, Chung, C, Han, DC, Chang, JK. *Continuous plasma separation from whole blood using microchannel geometry*. Proceedings of IEEE EMBS, May 12-15, 2005, Oahu, Hawaii.
- [PAR 09] Park, J.S., Song, S.H. and Jung, H.I. (2009). *Continuous focusing of microparticles using inertial lift force and vorticity via multi-orifice microfluidic channels*. Lab on a Chip, **9**, 939-948.
- [PER 94] Péré, J.P. (1994). *La microscopie : Techniques d'étude en biologie*. Editions Nathan Université, Collection 128 Sciences.
- [PET 05] Petersson, F., Nilsson, A., Holm, C., Jönsson, H. and Laurell, T. (2006). *Continuous separation of lipid particles from erythrocytes by means of laminar flow and acoustic standing wave forces*. Lab on a Chip, **5**, 20-22.
- [PET 06] Petersson, F., Aberg, L. and Laurell, T. (2006). *Acoustic separation of particles with similar acoustic properties by means of medium density manipulation*. Proceedings of μ TAS 2006, November 5-9, 2006, Tokyo, Japan, 540-542.
- [PIC 09] Picot, V. (2009). *Dispositifs microfluidiques et packaging associé pour le fractionnement sanguin*. Rapport de stage ingénieur.
- [PRE 06] Pregibon, D.C., Toner, M. and Doyle, P.S. (2006). *Magnetically and biologically active bead-patterned hydrogels*. Langmuir, **22**, 5122-5128.
- [PUG 07] Puget, P. (2007). Chapitre 20 : laboratoires sur puce. Les nanosciences, tome 3 : Nanobiotechnologies et nanobiologie. Editions Belin, Collection Echelles.
- [REG 09] Regehr, K.J., Domenech, M., Koepsel, J.T., Carver, K.C., Ellison-Zelski, S.J., Murphy, W.L., Schuler, L.A., Alarid, E.T. and Beebe, D.J. (2009). *Biological implications of polydimethylsiloxane-based microfluidic cell culture*. Lab on a Chip, **9**, 2132-2139.
- [REY 02] Reyes, D.R., Iossifidis, D., Auroux, P.A. and Manz, A. (2002). *Micro Total Analysis Systems. 1. Introduction, theory, and technology*. Anal. Chem., **74**, 2623-2636.
- [RIE 07] Riegger, L., Grumann, M., Steigert, J., Lutz, S., Steinert, C.P., Mueller, C., Viertel, J., Prucker, O., Rühle, J., Zengerle, R., Ducleé, J. (2007). *Single-step centrifugal hematocrit determination on a 10- μ s processing device*. Biomed. Microdevices, **9**, 795-799.
- [ROS 07] Rostaing, H., Peponnet, C., Pouteau, P. and Sollier, E. (2007). *Dispositif de prélèvement sanguin comportant au moins un filtre*. Dépôt n° FR 07 07709, déposé le 02 Novembre 2007. Extension à l'étranger en cours.
- [ROS 08] Rostaing, H. (2008). *Rapport PicPrep, An 2*. Rapport interne.
- [SAI 08] Saias, L., Saliba, A.E., Viovy, J.L., Pierga, J.Y., Vielh, P. and Farace, F. (2008). *Microfluidic magnetic cell sorting system for cancer diagnosis*. Proceedings of μ Flu 2008, December 10-12, 2008, Bologna, Italia, μ FLU08-108.
- [SCH 89] Schonberg, J.A. and Hinch, E.J. (1989). *Inertial migration of a sphere in Poiseuille flow*. J. Fluid. Mech., **203**, 517-524.
- [SCH 08] Schultz, E., Galland, R., Du Bouëtiez, D., Flahaut, T., Planat-Chrétien, A., Lesbre, F., Hoang, A., Volland, H. and Perraut, F. (2008). *A novel fluorescence-based array biosensor : Principle and application to DNA hybridization assays*. Biosensors and Bioelectronics, **23**, 987-994.
- [SEG 62] Segre, G., and Silberberg, A. (1962). *Behaviour of macroscopic rigid spheres in Poiseuille flow Part 2. Experimental results and interpretation*. J. Fluid. Mech., **14**, 136-57.
- [SEK 06] Sekine, K., Revzin, A., Tompkins, R.G. and Toner, M. (2006). *Panning of multiple subsets of leukocytes on antibody-decorated poly(ethylene) glycol-coated glass slides*. Journal of Immunological Methods, **313**, 96-109.

- [SEK 07] Seki, M. (2007). Continuous particle classification in microfluidic systems. Proceedings of μ TAS 2007, October 7-11, 2007, Paris, France, 1228-1230.
- [SEO 07] Seo, J., Lean, M.H. and Kole, A. (2007). *Membrane free microfiltration by asymmetric inertial migration*. Applied Physics Letter, **91**, 033901.
- [SET 04] Sethu, P., Anahtar, M., Moldawer, L.L., Tompkins, R.G. and Toner, M. (2004). *Continuous flow microfluidic device for rapid erythrocyte lysis*. Anal. Chem., **76**, 6247-6253.
- [SET 06] Sethu, P., Moldawer, L.L., Mindrinos, M.N., Scumpia, P.O., Tannahill, C.L., Wilhelmy, J., Efron, P.A., Brownstein, B.H., Tompkins, R.G. and Toner, M. (2006). *Microfluidic isolation of leukocytes from whole blood for phenotype and gene expression analysis*. Anal. Chem., **78**, 5453-5461.
- [SET 06.2] Sethu, P., Sin, A. and Toner, M. (2006). *Microfluidic diffusive filter for apheresis (leukapheresis)*. Lab on a Chip, **6**, 83-89.
- [SHA 09] Shadpour, H., Sims, C.E., Allbritton, N.L. (2009). *Enrichment and expansion of cells using antibody-coated micropallet arrays*. Cytometry Part A, **75A**, 609-618.
- [SHE 03] Shelby, J.P., Lim, D.S.W., Kuo, J.S. and Chiu, D.T. (2003). *High radial acceleration in microvortices*. Nature, **425**.
- [SHE 05] Shevkoplyas, S.S., Yoshida, T., Munn, L.L. and Bitensky, M.W. (2005). *Biomimetic autoseparation of leukocytes from whole blood in a microfluidic device*. Anal. Chem., **77**, 933-937.
- [SHE 06] Shevkoplyas, S.S., Yoshida, T., Gifford, S.C. and Bitensky, M.W. (2006). *Direct measurement of the impact of impaired erythrocyte deformability on microvascular network perfusion in a microfluidic device*. Lab on a Chip, **6**, 914-920.
- [SIL 01] Silbernagl, S. and Despopoulos, A. (2001). *Atlas de poche de physiologie*. Editions Flammarion Médecine-Science, Collection Atlas de Poche.
- [SOL 06] Sollier, E. (2006). *Mise au point d'une puce à protéines pour la détection de cellules*. Rapport de stage ingénieur.
- [SOL 07] Sollier, E., Rostaing, H., Fouillet, Y., Achard, J.L. and Pouteau, P. (2007). *Hydrodynamic microsystems for non diluted blood fragmentation*. Proceedings of μ TAS 2007, October 7-11, 2007, Paris, France, 733-735.
- [SOL 08] Sollier, E., Rostaing, H., Fouillet, Y., Achard, J.L. and Pouteau, P. (2008). *Passive microfluidic devices for plasma extraction from whole human blood*. Proceedings of μ Flu 2008, December 10-12, 2008, Bologna, Italia, μ FLU08-83.
- [SOL 09.1] Sollier, E., Rostaing, H., Pouteau, P., Fouillet, Y. and Achard, J.L. (2009). *Passive microfluidic devices for plasma extraction from whole human blood*. Sensors and Actuators: B. Chemical, **141**, 617-624.
- [SOL 09.2] Sollier, E., Cubizolles, M., Fouillet, Y. and Achard, J.L. (2009). *Fast and continuous plasma extraction from whole human blood based on expanding cell-free layer devices*. Biomed. Microdevices, **accepté**.
- [SOL 09.3] Sollier, E., Cubizolles, M., Faivre, M., Fouillet, Y. and Achard, J.L. (2009). *A passive microfluidic device for plasma extraction from whole human blood*. Proceedings of IEEE EMBC 2009, September 2-6, 2009, Minneapolis, USA, 7030-7033.
- [SOL 09.4] Sollier, E., Faivre, M., Cubizolles, M., Alessio, M., Fouillet, Y., Peponnet, C., Caillat, P. and Achard, J.L. (2009). *A microfluidic system to extract plasma from human blood*. Nanobio 2009, June 16-18, 2009, Grenoble, France.

- [SOL 09.5] Sollier, E., Faivre, M., Cubizolles, M., Nonglaton, G., Fontelaye, C., Costa, G., Sadet, S., Vinet, F. and Caillat, P. (2009). *Specific capture of blood cells by Ab/Ag binding*. Nanobio 2009, June 16-18, 2009, Grenoble, France.
- [SOO 07] SooHoo, J. and Walker, G. (2007). *Microfluidic liquid filter for leukocyte isolation*. Proceedings of IEEE EMBS 2007, August 23-26, 2007, Lyon, France, 6318-6321.
- [SQU 05] Squires, T.M. and Quake, S.R. (2005). *Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale*. Reviews of modern physics, **77**, 977-1026.
- [SRI 04] Srinivasan, V., Pamula, V.K. and Fair, R.B. (2004). *An integrated digital microfluidic lab-on-a-chip for clinical diagnostics on human physiological fluids*. Lab on a chip, **4**, 310-315.
- [STE 05] Stegmayr, B.G. (2005). *A survey of blood purification techniques, Transfusion and apheresis*. Science, **32**, 209-220.
- [STE 05.2] Steigert, J., Grumann, M., Brenner, T., Mittenbühler, K., Nann, T., Rühe, J., Moser, I., Haeberle, S., Riegger, L., Riegler, J., Bessler, W., Zengerle, R. and Ducrée, J. (2005). *Integrated sample preparation, reaction, and detection on a high-frequency centrifugal microfluidic platform*. JALA, 331-341.
- [STE 06] Steigert, J., Grumann, M., Brenner, T., Riegger, L., Harter, J., Zengerle, R. and Ducrée, J. (2006). *Fully integrated whole blood testing by real-time absorption measurement on a centrifugal platform*. Lab on a Chip, **6**, 1040-1044.
- [STR 02] Strooke, A.D., Dertinger, S.K.W., Adjari, A., Mezic, I., Stone, H.A. and Whitesides, G.M. (2002). Chaotic mixer for microchannels. Science, **295**, 647-651.
- [SUD 06.1] Sudarsan, A.P. and Ugaz, V.M. (2006). *Multivortex micromixing*. PNAS, **103**, 7228-7233.
- [SUD 06.2] Sudarsan, A.P. and Ugaz, V.M. (2006). *Fluid mixing in planar spiral microchannels*. Lab on a Chip, **6**, 74-82.
- [TAB 03] Tabeling, P. (2003). *Introduction à la microfluidique*. Editions Belin, Collection Echelles.
- [TAC 09] Tachi, T., Kaji, N., Tokeshi, M., Baba, Y. (2009). *Simultaneous separation, metering, and dilution of plasma from human whole blood in a microfluidic system*. Anal. Chem., **81**, 3194-3198.
- [TAG 07] Takagi, J., Yamada, M., Yasuda, M. and Seki, M. (2007). *Continuous particle separation in a microchannel having asymmetrically arranged multiple branches*. Lab on a Chip, **5**, 778-784.
- [TAJ 09] Tajiri, K., Kishi, H., Ozawa, T., Sugiyama, T. and Muraguchi, A. (2009). *SFMAC: A novel method for analysing multiple parameters on lymphocytes with a single fluorophore in cell-microarray system*. Cytometry Part A, **75A**, 282-288.
- [TAN 08] Tan, F.P.P., Soloperto, G., Bashford, S., Wood, N.B., Thom, S., Hughes, A. and Xu, X.Y. (2008). *Analysis of flow disturbance in a stenosed carotid artery bifurcation using two-equations transitional and turbulence models*. Journal of biomechanical engineering, **130**, 061008.
- [TIB 02] Tibben A.G.J., de Grooth, B.G., Greve, J., Dolan, G.J., Rao, C. and Terstappen, L.W.M.M. (2002). *Magnetic field design for selecting and aligning immunomagnetic labelled cells*. Cytometry, **47**, 163-172.
- [TON 05] Toner, M. And Irimia, D. (2005). *Blood on a Chip*. Annu. Rev. Biomed. Eng., **7**, 77-103.
- [TOU 05] Tourovskaia, A., Figueroa-Masot, X. and Folch, A. (2005). *Differentiation-on-a-chip: a microfluidic platform for long-term cell culture studies*. Lab on a Chip, **5**, 14-19.
- [THU 89] Thurston, G.B. (1989). *Plasma release-cell layering theory for blood flow*. Biorheology, **26**, 199-214.

- [TSU 09] Tsutsui, H. And Ho, C.M. (2009). *Cell separation by non inertial force fields in microfluidic systems*. Mechanics Research Communications, **36**, 92-103.
- [VAN 06] VanDeLinder, V., & Groisman, A. (2006). *Separation of plasma from whole human blood in continuous cross flow in a molded microfluidic device*. Anal. Chem., **78**, 3765-3771.
- [VAN 07] VanDeLinder, V., & Groisman, A. (2007). *Perfusion in microfluidic cross-flow: separation of white blood cells from whole blood and exchange of medium in a continuous flow*. Anal. Chem., **79**, 2023-2030.
- [VER 09] Verdier, C., Couzon, C., Duperray, A. and Singh, P. (2009). *Modeling cell interactions under flow*. J. Math. Biol., **58**, 235-259.
- [VIL 04] Vilkner, T., Janasek, D. and Manz, A. (2004). *Micro Total Analysis Systems. Recent developments*. Anal. Chem., **76**, 3373-3386.
- [VIN 02] Vinet, F. and Hoang, A. (2002). US Patent WO02051856.
- [VIT 03] Vito, R.P. and Dixon, S.A. (2003). *Blood vessel constitutive models, 1995-2002*. Annu. Rev. Biomed. Eng., **5**, 413-439.
- [WAN 05] Wang, M.M., Tu, E., Raymond, D.E., Yang, J.M., Zhang, H., Hagen, N., Dees, B., Mercer, E.M., Forster, A.H., Kariv, I., Marchand, P.J. and Butler, W.F. (2005). *Microfluidic sorting of mammalian cells by optical forces switching*. Nature Biotechnology, **23**, 83-87.
- [WIK 06.1] Wiklund, M., Hultström, J., Manneberg, O. and Hertz, H.M. (2006). *Ultrasonic manipulation in a microfluidic chip for individual handling of particles and cells*. Proceedings of μ TAS 2006, November 5-9, 2006, Tokyo, Japan, 446-448.
- [WIK 06.2] Wiklund, M. and Hertz, H.M. (2006). *Ultrasonic enhancement of bead-based bioaffinity assays*. Lab on a Chip, **6**, 1279-1292.
- [WU 06] Wu, D., Zhao, B., Dai, Z., Qin, J. and Lin, B. (2006). *Grafting epoxy-modified hydrophilic polymers onto poly(dimethylsiloxane) microfluidic chip to resist nonspecific protein adsorption*. Lab on a Chip, **6**, 942-947.
- [XIA 06] Xia, N., Hunt, T.P., Mayers, B.T., Alsberg, E., Whitesides, G.M., Westervelt, R.M. and Ingber, D.E. (2006). *Combined microfluidic-micromagnetic separation of living cells in continuous flow*. Biomed. Microdevices, **8**, 299-308.
- [YAM 05] Yamada, M. and Seki, M. (2005). *Hydrodynamic filtration for on-chip concentration and classification utilizing microfluidic*. Lab on a Chip, **5**, 1233-1239.
- [YAN 06] Yang, S., Ündar, A. and Zahn, J.D. (2006). *A microfluidic device for continuous, real time blood plasma separation*. Lab on a Chip, **6**, 871-880.
- [YAO 04] Yao, B., Luo, G., Feng, X., Wang, W., Chen, L. and Wang, Y. (2004). *A microfluidic device based on gravity and electric force driving for flow cytometry and fluorescence activated cell sorting*. Lab on a Chip, **4**, 603-607.
- [YOB 06] Yobas, L., Ji, H.M., Hui, W.C., Chen, Y., Lim, T.M., Heng, C.K. and Kwong, D.L. (2006). *Nucleic acid extraction, amplification, and detection on Si-based microfluidic platforms*. Proceedings of IEEE CICC 2006, September 10-13, 2006, San José, USA, 465-472.
- [YOO 06] Yoon, S. Y., Yang, S., Moon, J. H., & Kim, K. C. (2006). *Continuous separation of blood plasma using sedimentation in a microchannel*. Proceedings of μ TAS 2006, November 5-9, 2006, Tokyo, Japan, 1154-1156.

[ZHE 05] Zheng, G., Patolsky, F., Cui, Y., Wanf, W.U. and Lieber, C.M. (2005). *Multiplexed electrical detection of cancer markers with nanowire sensor arrays*. Nature Biotechnology, **23**, 1295-1301.